

ISSN 1999-9127

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

МОЛЕКУЛЯРНАЯ И ПРИКЛАДНАЯ ГЕНЕТИКА

**СБОРНИК НАУЧНЫХ ТРУДОВ
ТОМ 28**

Издается с 2005 года
Выходит два раза в год

Минск
2020

Молекулярная и прикладная генетика: сб. науч. тр. / Институт генетики и цитологии НАН Беларуси; редкол.: А. В. Кильчевский (гл. ред.) [и др.]. — Минск: Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, 2020. — Т. 28. — 118 с. — ISSN 1999-9127.

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

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

Редакционная коллегия:

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

СОДЕРЖАНИЕ

<i>А. М. Шишлова-Соколовская, Е. П. Кветко, П. В. Кузмицкая, О. Ю. Урбанович, Г. Б. Боровский</i> Создание трансгенных растений <i>Nicotiana tabacum</i> с инсерцией гена <i>TaDHN19.3</i> , кодирующего дегидрин озимой пшеницы	5
<i>В. Е. Розенцвейг, Е. А. Аксенова, Д. В. Голоенко, О. В. Шаблинская, О. П. Шатарнов, Т. М. Шатарнова, О. Г. Давыденко</i> Модель засухоустойчивого сорта сои для климатических условий Беларуси.....	15
<i>О. А. Орловская, С. И. Вакула, Л. В. Хотылёва, А. В. Кильчевский</i> Минеральный состав зерна линий мягкой пшеницы с интрогрессиями генетического материала видов рода <i>Triticum</i>	26
<i>Е. В. Гузенко, М. В. Богданова, В. И. Сакович, В. А. Лемеш</i> Поиск микросателлитных локусов, ассоциированных с длительностью фаз развития при пониженной влагообеспеченности, у льна масличного (<i>Linum usitatissimum</i> L.)	33
<i>П. С. Кирьянов, О. Ю. Баранов</i> Структурная организация генов 18S и 28S рибосомной РНК карельской березы.....	46
<i>Г. В. Мозгова, А. Н. Островская, В. А. Лемеш, В. С. Остапчик, Н. И. Дробот</i> Использование технологии цифровой капельной ПЦР для детекции и абсолютного количественного определения ГМ-линий растений.....	57
<i>О. М. Малышева, Е. П. Михаленко, М. В. Артюшевская, А. П. Сухарева, К. А. Гомолко, А. В. Кильчевский, Г. А. Шишко</i> Полиморфизмы генов <i>MMP2</i> и <i>MMP9</i> у недоношенных новорожденных с синдромом дыхательных расстройств.....	69
<i>В. Н. Кипень, М. В. Богданова, А. А. Буракова, О. В. Зотова, О. И. Добыш, Т. С. Королева, А. В. Байда, А. Г. Булгак, С. А. Брускин, В. А. Лемеш</i> Предсказательный потенциал СрG-маркеров для определения хронологического возраста человека	80
<i>Н. Г. Седляр, И. Б. Моссэ, Л. А. Кундас, А. Л. Гончар, М. Д. Амелянович</i> Оценка риска невынашивания беременности на основе молекулярно-генетического анализа	91
<i>А. А. Гусина, А. С. Сталыбко, М. И. Колыбенко, Н. П. Бортновская, Н. Б. Гусина</i> Случай неонатального синдрома Марфана, обусловленный новой мутацией в гене <i>FBN1</i> ...	104

CONTENTS

<i>A. M. Shishlova-Sokolovskaya, E. P. Kvetko, P. V. Kuzmitskaya, O. Yu. Urbanovich, G. B. Borovsky</i> Development of transgenic <i>Nicotiana tabacum</i> plants with the insertion of the <i>TaDHN19.3</i> gene encoding winter wheat dehydrin.....	5
<i>V. E. Rosenzweig, E. A. Aksyonova, D. V. Goloenko, O. V. Shablinskaya, O. P. Shatarnov, T. M. Shatarnova, O. G. Davydenko</i> Soybean drought resistant cultivar model for the climatic conditions of Belarus.....	15
<i>O. A. Orlovskaya, S. I. Vakula, L. V. Khotyleva, A. V. Kilchevsky</i> Grain mineral composition of bread wheat lines with introgressions of the <i>Triticum</i> species genetic material.....	26
<i>E. V. Guzenko, M. V. Bogdanova, V. I. Sakovich, V. A. Lemesh</i> Search for microsatellite loci associated with a period of development phases under the conditions of reduced water availability in oil flax (<i>Linum usitatissimum</i> L.).....	33
<i>P. S. Kiryanov, O. Yu. Baranov</i> Structural organization of the 18S and 28S ribosomal RNA genes of curly birch.....	46
<i>G. V. Mozgova, A. N. Astrouskaya, V. A. Lemesh, V. S. Ostapchik, N. I. Drobot</i> Use of Droplet Digital PCR for the detection and absolute quantification of GMO lines	57
<i>V. M. Malyshava, A. P. Mikhaleuka, M. V. Artsiusheuskaya, A. P. Sukharava, K. A. Gamolka, A. V. Kilchevsky, G. A. Shyshko</i> Polymorphisms of <i>MMP2</i> and <i>MMP9</i> genes in premature newborns with respiratory distress syndrome.....	69
<i>V. N. Kipen, M. V. Bahdanava, A. A. Burakova, O. V. Zotova, O. I. Dobysh, T. S. Koroleva, A. V. Baida, A. G. Bulgak, S. A. Bruskin, V. A. Lemesh</i> Predictive potential of CpG markers in the determination of chronological human age	80
<i>N. G. Sedlyar, I. B. Mosse, L. A. Kundas, A. L. Gonchar, M. D. Ameliyanovich</i> Assessment of a miscarriage risk based on the molecular genetic analysis.....	91
<i>A. A. Gusina, A. S. Stalybko, M. I. Kolybenko, N. P. Bartnovskaja, N. B. Gusina</i> A case of neonatal Marfan syndrome caused by a new mutation in the <i>FBN1</i> gene.....	104

А. М. Шишлова-Соколовская¹, Е. П. Кветко¹, П. В. Кузмицкая¹, О. Ю. Урбанович¹, Г. Б. Боровский²

СОЗДАНИЕ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ *NICOTIANA TABACUM* С ИНСЕРЦИЕЙ ГЕНА *TaDHN19.3*, КОДИРУЮЩЕГО ДЕГИДРИН ОЗИМОЙ ПШЕНИЦЫ

¹Государственное научное учреждение
«Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси»
Республика Беларусь, 220072, г. Минск, ул. Академическая, 27
e-mail: s_anastasia78@mail.ru

²Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Сибирский институт физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук»
Российская федерация, 664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132
e-mail: borovskii@sifibr.irk.ru

С целью изучения влияния гена *TaDHN19.3*, кодирующего дегидрин озимой пшеницы, на развитие толерантности к низким температурам нами была создана генетическая векторная конструкция pBI121_TaDHN19/EGFP на основе бинарного вектора pBI121. В данной конструкции ген *TaDHN19.3*, выделенный из озимой пшеницы (*Triticum aestivum*) сорта белорусской селекции Капылянка, находится в слитой рамке считывания с геном зеленого флуоресцентного белка EGFP. Используя метод *Agrobacterium*-опосредованной трансформации листовых дисков, с помощью генетической векторной конструкции pBI121_TaDHN19/EGFP были получены трансгенные растения *Nicotiana tabacum*, экспрессирующие химерный ген.

Ключевые слова: *Nicotiana tabacum* cv. *Petit Havana SR1*, ген *ndb2*, *Triticum aestivum*, *Escherichia coli* dh5a, *Agrobacterium tumefaciens*, ген *TaDHN19.3*, кодирующий дегидрин озимой пшеницы, ген *EGFP*, холодостойкость.

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 длительном воздействии стресса приводят их к гибели [1, 2]. Для растений, подвергшихся холодовому стрессу, характерны нарушения ферментативных реакций, скорости передвижения субстратов, мембранного транспорта и др. [3]. При температурном воздействии происходит индукция синтеза белков, ассоциированных со стрессом, на фоне замедления или прекращения общего белкового синтеза [4]. Холодовая акклиматизация растений ассоциируется со специфическими генами, экспрессия которых приводит к изме-

нению метаболизма и физиологических функций, затрагивая уровни фитогормонов и антиоксидантов, осмолитов и защитных белков, в том числе и шаперонов, а также белков с неизвестными пока функциями [5, 6]. Выделяют несколько главных этапов в ответе клеток на стресс: образование сигналов, которые передаются в ядро и взаимодействуют с генами, изменяя их экспрессию; индукция или репрессия синтеза специфических мРНК и их трансляции; образование стрессовых белков [7–11]. Стрессовые белки синтезируются в количестве до 2% от белков, образующихся в нормальных условиях, причем их синтез носит временный характер [12]. Среди таких белков особое место принадлежит дегидринам, экспрессия генов которых и накопление белкового продукта происходит при водном дефиците, засолении, гипотермии, вызывающих нарушение водного баланса [13–15].

Дегидрины относятся к классу LEA-белков (Late embryogenesis abundant) — белков

позднего эмбриогенеза растений, характеризующихся высокой гидрофильностью, термостабильностью. Данные белки обнаружены во всех таксономических группах царства растений [13, 16]. Класс LEA-белков включает 5 разнородных белковых групп, при этом дегидрины объединяются в самостоятельную II группу или D11 семейства LEA-белков [13, 17]. Локализуются дегидрины главным образом в цитоплазме, ядрах клеток растений, митохондриях, хлоропластах [18, 19]. На основании сравнительного анализа нуклеотидных и соответствующих аминокислотных последовательностей была разработана классификация дегидринов, согласно которой различают 5 классов данных белков: YnSK₂, Kn, KnS, SKn, Y₂Kn [13, 20]. Принадлежность дегидринов к вышеперечисленным классам определяется наличием консервативных участков, условно обозначенных K-, Y-, S-сегментов [13, 20, 21]. Дегидрины относят к неструктурированным белкам с высокой степенью конформационной лабильности. Сочетание вариабельных сегментов Y, S с консервативным K-сегментом определяет функциональные свойства дегидринов [6, 15, 22].

Низкая температура является главным стрессовым фактором, индуцирующим экспрессию генов, кодирующих дегидрины. В условиях низких температур происходит нарушение водного баланса, а физико-химические и структурные особенности дегидринов обуславливают их вовлечение в сохранение целостности клеточной структуры и мембран, в защиту биополимеров клетки, предотвращая их денатурацию и последующую коагуляцию в условиях обезвоживания клетки и проявление криопротекторной, антифризной, антиоксидантной и металлосвязывающей функций [6, 15, 22].

Несмотря на значительное количество работ, посвященных дегидринам, роль отдельных генов этого класса в ответе на стресс остается

не до конца выясненной. Удобной моделью для выяснения роли дегидринов в устойчивости растений к стрессу в настоящее время являются трансгенные растения. Защитная роль дегидринов в растениях показана в ряде работ по созданию трансгенных растений и в исследованиях по устойчивости к засухе, засолению и неблагоприятным температурным воздействиям на различных сортах сельскохозяйственных культур [15, 22]. Цель данной работы — создание трансгенных растений *Nicotiana tabacum*, несущих в своем геноме вставку гена *TaDHN19.3*, кодирующего дегидрин озимой пшеницы, для исследования влияния данного гена на развитие толерантности к низким температурам.

Материалы и методы

Создание векторных конструкций. Источником для клонирования нативного гена *TaDHN19.3* размером 375 п. о. послужили растения озимой пшеницы (*Triticum aestivum*) сорта белорусской селекции Капылянка. Препараты ДНК из зерен пшеницы выделяли с помощью Genomic DNA Purification Kit (Thermo Fisher Scientific, EC) согласно протоколу производителя. Для получения полноразмерного гена *TaDHN19.3* с открытой рамкой считывания использовали ПЦР с синтетическими олигонуклеотидами, представленными в таблице 1.

Продукты амплификации выделяли из агарозного геля с помощью набора реагентов Gene Jet™ Gel Extraction Kit (Thermo Fisher Scientific, EC). Выделенные ампликоны лигировали в плазмиду pTZ57R/T, которой трансформировали штамм *E. coli* DH5α с помощью Ins TAclone™ PCR Cloning Kit (Thermo Fisher Scientific, EC) согласно рекомендациям производителя. После выращивания на среде LB с антибиотиком ампициллином из трансформантов выделяли плазмидную ДНК с помощью Plasmid Gene Jet™ Miniprep Kit (Thermo Fisher

Таблица 1

Последовательности синтетических олигонуклеотидов, разработанных для амплификации гена *TaDHN19.3*

Название олигонуклеотида	Последовательность 5'-3'
TaDHN19F	AGATTTCCCGAGGGACAA
TaDHN19R	GAAGTTGGCCATCTTATTAT

Scientific, EC) согласно протоколу производителя. Фрагмент, встроенный в плазмидную ДНК, секвенировали с помощью праймеров к последовательности полилинкера вектора pTZ57R/T M13F (GTAAAACGACGGCCAGT) и M13R (CAGGAAACAGCTATGAC). Для проведения реакции секвенирования по Сэнгену использовали набор реагентов Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, США). Анализ полученной нуклеотидной последовательности выполняли с помощью программы Mega6, CLUSTALW и алгоритма BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) [23–25]. Полученный в результате секвенирования полноразмерный ген *TaDHN19.3* с открытой рамкой считывания размером 375 п. о. далее использовали для создания генетической конструкции pBI121_TaDHN19/EGFP.

Основой для создания генетической конструкции pBI121_TaDHN19/EGFP служил бинарный вектор pBI121 [26]. Донором гена *EGFP* служил вектор pEGFP, содержащий ген *EGFP* размером 720 п. о. Для того чтобы амплифицировать полноразмерные гены зеленого флуоресцентного белка (*EGFP*), дегидрина пшеницы (*TADHN19.3*) с дополнительными сайтами эндонуклеаз рестрикции и ген *TaDHN19.3* в одной транскрипционной рамке с геном *EGFP* без стоп-кодона и с шарниром на 5'-конце были использованы синтетические олигонуклеотиды, представленные в таблице 2. Подбор олигонуклеотидов осуществлялся с помощью программы SnapGene.

Объем смеси для амплификации полноразмерных генов *EGFP*, *TaDHN19.3* и *TADHN19/EGFP* с дополнительными сайтами эндону-

клеаз рестрикции для одного образца составлял 50 мкл. В смесь входили следующие реагенты: 1–200 нг ДНК, 5 мкл 10X буфера Tersus Plus buffer фирмы Евроген, 5 мкл 10мМ смеси нуклеотидов (dNTP) (Thermo Fisher Scientific, EC), 5 мкл каждого из праймеров, 1 мкл 50x Tersus-polymerase Mix (Евроген), 19 мкл H₂O. Амплификацию проводили в амплификаторе «BioRad» с использованием следующих программ для гена *EGFP*: денатурация — 94 °C 4 мин; отжиг праймеров — 94 °C 1 мин; 63 °C 45 сек; 72 °C 1 мин, 30 циклов; ренатурация — 72 °C 5 мин; 4 °C ∞ мин. Для гена *TaDHN19.3*: денатурация — 94 °C 4 мин; отжиг праймеров — 94 °C 1 мин; 60 °C 45 сек; 72 °C 1 мин, 30 циклов; ренатурация — 72 °C 5 мин; 4 °C ∞ мин. Для химерного гена *TaDHN19/EGFP*: денатурация — 94 °C 5 мин; отжиг праймеров — 94 °C 1 мин; 65 °C 1 мин; 72 °C 1 мин, 35 циклов; ренатурация — 72 °C 7 мин; 4 °C ∞ мин. Продукт реакции разделяли в 1% агарозном геле с бромистым этидием в электрическом поле с помощью камеры для горизонтального электрофореза фирмы «BioRad». Фрагмент после электрофореза визуализировали с помощью системы BioRad GelDoc2000.

Синтез химерного гена *TaDHN19/EGFP* проводили методом лигирования с использованием T4 лигазы (Thermo Fisher Scientific, EC) по сайту эндонуклеазы рестрикции *Bam*HI, предварительно введенному в полноразмерные гены *EGFP*, *TaDHN19.3* методом ПЦР. Полученный химерный ген *TaDHN19/EGFP* клонировали в вектор pBI121 по сайтам узнавания эндонуклеаз рестрикции *Xba*I и *Sac*I. Для трансформации бактериальных клеток

Таблица 2
Последовательность и температура отжига синтетических олигонуклеотидов, использованных при создании векторной конструкции

Название олигонуклеотида	Последовательность 5'-3'	Температура отжига, °C
deg-F	cccggtctagaacaatggagcaccaggggcacggcgaggcg	78
deg-R	ggatccgtgtgtccaggcag	62
egfp-F	ggatccccgggtaccgggtgacccacctaggtgagcaagggcgag	74
egfp-R	ggtaccgagctcttactgttacagctcgtc	64
deg/egfp -F	cccggtctagaacaatggagcaccaggggcacggcgaggcg	78
deg/egfp -R	ggtaccgagctcttactgttacagctcgtc	64

Eserishia coli штамма DH5α лигационной смесью, содержащей плазмидную ДНК, был выбран метод теплового шока.

Трансформацию *Agrobacterium tumifaciens* штамма ЕНА105 осуществляли по одной из общепринятых методик, а именно с помощью трехродительского скрещивания [26]. 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 колониях подтверждали методом ПЦР со специфичными праймерами к гетерологичному гену *TaDHN19/EGFP*. Рекомбинантные колонии *Agrobacterium tumifaciens* штамма ЕНА105, в которых было подтверждено методом ПЦР наличие целевой векторной конструкции, далее использовали в *Agrobacterium*-опосредованной трансформации листовых дисков *Nicotiana tabacum* sv. *Petit Havana SR1*.

Агробактериальная трансформация. В качестве объекта для стабильной интеграции и изучения эффективной работы конструкции pBI121_ TaDHN19/EGFP использовалась линия табака *Nicotiana tabacum* cv. *Petit Havana SR1*. Для введения гетерологичного гена *TaDHN19/EGFP* применяли *Agrobacterium*-опосредованную трансформацию листовых дисков 3–4-недельных растений табака, выращенных в асептических условиях (температура 24 °С, освещенность 4000–5000 люкс при 16/8 (свет/темнота) фотопериоде). 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, EC) по методике изготовителя. Интеграцию гетерологичного гена в растительный геном определяли с помощью ПЦР. Объем смеси для амплификации одного образца составлял 25 мкл, в смесь входили следующие реагенты: 100–200 нг ДНК, 2,5 мкл 10X буфера с $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ фирмы (Thermo Fisher Scientific, EC), 2,5 мкл 10мМ смеси нуклеотидов (dNTP) (Thermo Fisher Scientific, EC),

2 мкл 25мМ MgCl_2 (Thermo Fisher Scientific, EC), 2,5 мкл каждого из праймеров, 0,2 мкл 5ед. Taq ДНК-полимеразы (Thermo Fisher Scientific, EC), 10,7 мкл H_2O . Для идентификации присутствия гетерологичного гена *TaDHN19/EGFP* использовали специфические праймеры, представленные в таблице 1. Амплификацию проводили в амплификаторе «BioRad» с использованием следующей программы: денатурация — 94 °С 5 мин; отжиг праймеров — 94 °С 1 мин; 65 °С 1 мин; 72 °С 1 мин, 35 циклов; ренатурация — 72 °С 7 мин; 4 °С ∞ мин. Продукт реакции разделяли в электрическом поле с помощью камеры для горизонтального электрофореза фирмы «BioRad» в 1% агарозном геле с бромистым этидием. Фрагмент после электрофореза визуализировали с помощью системы BioRad GelDoc2000.

Транскрипционную активность химерного гена *TaDHN19/EGFP* в трансформантах табака подтверждали с помощью метода ОТ-ПЦР. Для этого выделяли тотальную РНК с помощью набора реагентов Gene JET Plant RNA Purification Mini Kit (Thermo Fisher Scientific, EC) по методике изготовителя. Синтез кДНК на матрице РНК осуществлялось с помощью набора реагентов First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific, EC) по методике изготовителя. Дальнейший ПЦР-анализ на основе синтезированной кДНК, комплементарной мРНК, проводили в амплификаторе «BioRad» с использованием специфических праймеров и программы, описанных выше. Продукт реакции разделяли в 1% агарозном геле с бромистым этидием в электрическом поле с помощью камеры для горизонтального электрофореза фирмы «BioRad». После электрофореза фрагмент визуализировали с помощью системы GelDoc2000 BioRad.

Результаты и обсуждение

Известно, что экспрессия дегидринов является одним из компонентов системы защиты растений от абиотического стресса. В формировании ответа растения на холодостресс принимают участие дегидрины SK₃-, Kп- и KS-типов. На первом этапе данной работы было проведено изучение вариативности нуклеотидных последовательностей гена *TaDHN19.3* по классификации Wang et al. [27], относящегося к типу K-3 у сортов пшеницы,

созданных на разной генетической основе. Интерес к этому локусу обусловлен участием кодируемого им продукта в защите растения от воздействия различных неблагоприятных абиотических факторов. Так, было показано, что экспрессия белков, кодируемых геном *TaDHN19.3*, возрастает при дегидратации и охлаждении в корнях и листьях растений пшеницы и только в корнях – при засолении [27].

На основании нуклеотидной последовательности мРНК, кодирующей дегидрин *TaDHN19.3* (номер доступа в GenBank AB272228), были разработаны синтетические олигонуклеотиды, позволяющие амплифицировать полноразмерную открытую рамку считывания гена *TaDHN19.3* (табл. 1). С помощью данных олигонуклеотидов были получены последовательности генов *TaDHN19.3* из 6 сортов яровой и озимой пшеницы. В случае сорта Фантазия было получено 2 аллельных варианта данного гена. Анализ выравниваний нуклеотидных последовательностей открытых рамок считывания, кодирующих дегидрины *TaDHN19.3*, показал их высокую консервативность. Степень идентичности колебалась в пределах 98,23–100%. Так, полностью идентичными оказались последовательности, выделенные из сортов Каравай, Капылянка, Сукцесс, один из аллельных вариантов сорта Фантазия, а также последовательность из базы данных GenBank AB272228, полученная из японского сорта Chihoku. Наибольшее число отличий от других гомологичных генов имел один из аллелей, выделенных из пшеницы сорта Фантазия. Сравнение нуклеотидных последовательностей генов *TaDHN19.3*, выделенных из геномов пшеницы, созданных на разной генетической основе, показало присутствие точечных мутаций. Все они являлись однонуклеотидными заменами, инсерций и делеций обнаружено не было [28].

Трансляция открытых рамок считывания *in silico* и анализ последовательностей гипотетических белков показали степень идентичности в пределах 96,43–100%. Больше всего отличий по аминокислотному составу имел один из аллельных вариантов высокоустойчивого к холоду сорта Фантазия (3 аминокислотных замены). По одной аминокислотной замене было выявлено в аллельных вариантах гена *TaDHN19.3*, выделенных из сортов Бонпэйн

и Ростань. Примечательно, что оба эти сорта относятся к яровым формам.

Таким образом, различия в нуклеотидных последовательностях гена *TaDHN19.3*, по всей видимости, не могут объяснить разницу между устойчивостью к низким температурам между высокоустойчивыми озимыми сортами и яровыми. Поэтому с целью исследования функциональной активности гена *TaDHN19.3* и изучения его роли в формировании у растений толерантности к низким температурам на модельном объекте (*Nicotiana tabacum*) была создана векторная генетическая конструкция pBI121-*TaDHN19/EGFP*, содержащая ген *TaDHN19.3* в одной транскрипционной рамке с геном зеленого флуоресцентного белка EGFP. Источником для клонирования нативного гена *TaDHN19.3* для создания трансгенных растений служил сорт озимой пшеницы белорусской селекции Капылянка. Данный сорт обладает высокой устойчивостью к низким температурам.

С помощью метода ПЦР и синтетических олигонуклеотидов deg-F и deg-R была произведена модификация гена *TaDHN19.3*, а именно: на 5'-концевой участок были добавлены сайты узнавания эндонуклеазами рестрикции *XmaI*, *XbaI* и консенсусная последовательность Козака, на 3'-концевой участок — сайт узнавания эндонуклеазой рестрикции *BamHI*, также удален стоп-кодон. Полученный фрагмент амплификации соответствует теоретически ожидаемому — 394 п. о. Подбор и модификацию специфичных олигонуклеотидов к 5'- и 3'-концевым участкам гена *TaDHN19.3* проводили на основе нуклеотидной последовательности. Аналогичным способом был получен модифицированный ген *EGFP* размером 720 п. о. посредством синтетических олигонуклеотидов gfp-F и gfp-R. На 5'-концевой участок гена *EGFP* были добавлены сайт узнавания эндонуклеазой рестрикции *BamHI* и шарнир из 7 аминокислотных остатков — «pro-gly-thr-gly-arg-pro-thr» для гибкой связи доменов гибридного белка, а на 3'-концевой участок — сайты узнавания эндонуклеазами рестрикции *SacI*, *KpnI*.

Лигирование полноразмерных генов *TaDHN19.3* и *EGFP* проводили по предварительно введенному методом ПЦР сайту узнавания эндонуклеазой рестрикции *BamHI* для

получения химерного гена *TaDHN19/EGFP* размером 1147 п.о. Используя специфические праймеры к 5'-концевому участку гена *TaDHN19.3* и 3'-концевому участку гена *EGFP* из лигационной смеси был амплифицирован химерный ген *TaDHN19/EGFP* размером 1147 п. о. Полученный химерный ген *TaDHN19/EGFP* был клонирован в бинарный вектор pBI121 по сайтам узнавания эндонуклеазами рестрикции *XbaI* и *SacI*. Схема полученной векторной конструкции представлена на рисунке 1.

Генетическая конструкция pBI121_*TaDHN19/EGFP* содержит гетерологичный ген *TaDHN19/EGFP* под контролем конститутивного промотора из вируса мозаики цветной капусты (*CaMV 35S-promoter*) и нопалинсинтазного терминатора (*NOS-terminator*). Кроме этого, векторная конструкция несет селективный ген *NeoR/KanR* устойчивости к антибиотику канамицину для отбора растительных трансформантов.

Для создания трансгенных растений табака, несущих в своем геноме ген *TaDHN19/EGFP*, был использован метод *Agrobacterium*-опосредованной трансформации.

Методом трехродительского скрещивания созданная генетическая конструкция была

введена в агробактериальный штамм ЕНА105. Отбор рекомбинантных штаммов проводили на селективной среде. Инсерция гетерологичного гена *TaDHN19/EGFP* в рекомбинантных клонах *Agrobacterium tumefaciens* была подтверждена методом ПЦР.

В качестве эксплантов при *Agrobacterium*-опосредованной трансформации были использованы листовые диски, полученные из листьев 3–4-недельных растений табака, выращенных в подобранных ранее условиях [29].

В результате *Agrobacterium*-опосредованной трансформации листовых дисков табака конструкцией pBI121_*TaDHN19/EGFP* из морфогенного каллуса (частота каллусогенеза составила 95%) было получено 28 первичных регенерантов. В процессе культивирования корни образовали 4 регенеранта. Частота регенерации составила 14,28% от количества первичных регенерантов.

Регенеранты, полученные в результате *Agrobacterium*-опосредованной трансформации с помощью конструкции pBI121_*TaDHN19/EGFP*, в дальнейшем подвергались молекулярно-генетическому анализу. Соматическая изменчивость в культуре *in vitro* при отборе на

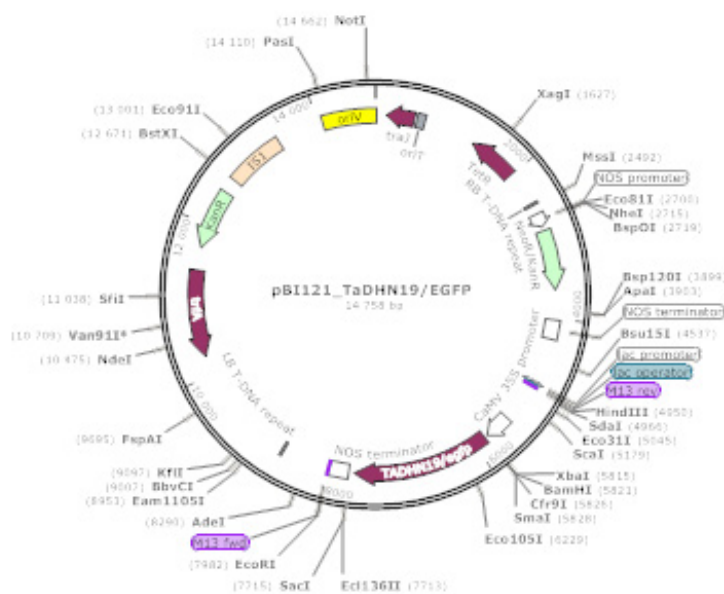


Рис. 1. Схема векторной конструкции pBI121_*TaDHN19/EGFP*:RB T-DNA repeat

LB T-DNA repeat — правый и левый концевые повторы области Т-ДНК; *TaDHN19/EGFP* — химерный ген, состоящий из гена *TaDHN19* дегидрина пшеницы и гена *EGFP*; *NOS-promotor* — промотор нопалин-синтазы; *KanR* — ген аминогликозид фосфотрансферазы для селекции бактерий; *NeoR/KanR* — ген аминогликозид фосфотрансферазы из транспозона Tn5 для селекции растительных трансформантов; *NOS-terminator* — нопалин-синтазный терминатор; *CaMV 35S-promoter* — конститутивный промотор из вируса мозаики цветной капусты

селективной среде, содержащей антибиотик канамицин, не позволяет считать трансформанты истинными трансгенными растениями [30], поэтому для подтверждения интеграции гетерологичной вставки был проведен молекулярно-генетический анализ. Наличие гетерологичной инсерции определяли методом ПЦР в ДНК первичных регенерантов, отобранных на антибиотике канамицине, с использованием синтетических олигонуклеотидов deg/egfp-F и deg/egfp-R. Амплифицированный фрагмент размером 1147 п. н. свидетельствует о присутствии гетерологичной целевой последовательности в исследуемой растительной ДНК (рис. 2).

Экспрессия химерного гена *TaDHN19/EGFP* была подтверждена методом ОТ-ПЦР суммарной мРНК трансформантов, так как наличие чужеродного гена в растительном геноме не всегда определяет его функциональную активность и синтез белка в необходимом количестве (рис. 3). Значительное влияние на эффективность экспрессии гена оказывает место интеграции Т-ДНК в растительном геноме. В частности, интеграция гетерологичного гена в область гетерохроматина может привести к замолчанию трансгена, а также в процессе онтогенеза возможно изменение уровня экспрессии трансгена или его полная инактивация [31, 32].

Таким образом, в результате проведенного молекулярно-генетического анализа показано, что в геном *Nicotiana tabacum* с помощью векторной конструкции pBI121_ TaDHN19/EGFP

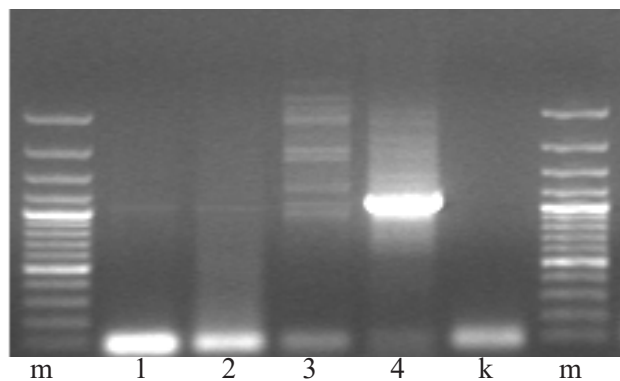


Рис. 2. Электрофореграмма ПЦР-продукта, выявленного при амплификации ДНК регенерантов табака со вставкой химерного гена *TaDHN19/EGFP*

m — маркер молекулярного веса GeneRuler 100 bp DNALadder (Thermo Fisher Scientific); 1–4 — анализируемые трансгенные растения; к. — исходное растение табака

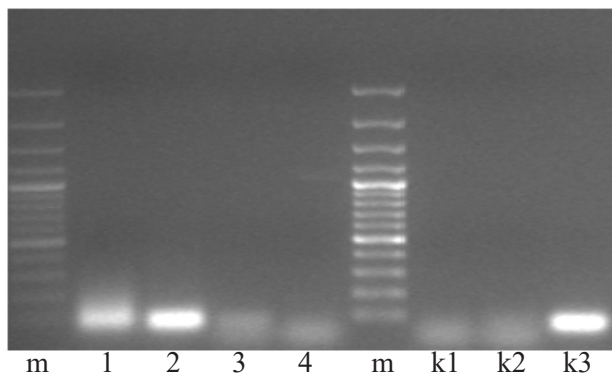


Рис. 3. Электрофореграмма ПЦР-продукта (1147 п. н.), выявленного при амплификации кДНК регенерантов табака, несущих инсерцию химерного гена *TaDHN19/EGFP*

m — маркер молекулярного веса GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific); 1–4 — анализируемые трансгенные растения; k1 — исходные растения табака; k2 — смесь реагентов синтеза к-ДНК; k3 — смесь ПЦР реагентов

посредством агробактериальной трансформации листовых дисков происходит перенос целевой последовательности, несущей нативный ген *TaDHN19.3*, кодирующий дегидрин озимой пшеницы, слитый с геном *EGFP*, и транскрипция целевой вставки.

Трансгенные растения являются удобной моделью для выяснения функции генов, вовлеченных в стрессовый ответ. Так, например, с их помощью показана роль генов DREB-семейства пшеницы и ячменя в ответе на засуху и холодостресс [33]. Также введение в геном растений генов, ассоциированных со стрессом, позволяет повысить их устойчивость к абиотическим факторам внешней среды. В частности, увеличение уровня экспрессии гена *HvSNAC1*, относящегося к транскрипционным факторам, привело к увеличению устойчивости ячменя к дефициту влаги на разных стадиях роста [34]. Экспрессия генов *DREB / CBF* под промотором HDZI-4 привела к значительному увеличению урожайности зерна трансгенной пшеницы. Экспрессия этих же генов под промоторами HDZI-3 и HDZI-4 повысила устойчивость к засухе и заморозкам трансгенный ячмень и морозоустойчивость трансгенных проростков пшеницы [35]. Сверхэкспрессия гена яблони *MdIAA9* в растениях табака значительно увеличила устойчивость к осмотическим стрессам [36].

Заключение

Используя методы молекулярного клонирования, создана векторная генетическая конструкция с геном *TaDHN19.3*, слитым с геном *EGFP*, кодирующим зеленый флуоресцентный белок. С помощью данной конструкции посредством *Agrobacterium*-опосредованной трансформации листовых дисков получены первичные трансгенные растения *Nicotiana tabacum*, экспрессирующие целевой ген. Полученные трансгенные растения табака, несущие в своем геноме химерный ген *TaDHN19/EGFP*, являются удобной моделью для изучения роли гена и места локализации белка дегидрина озимой пшеницы в ответе на моделируемые условия абиотического стресса. Дальнейший анализ созданных трансгенных растений позволит оценить влияние различных абиотических факторов на уровень экспрессии дегидрина озимой пшеницы. Не исключено также влияние измененной транскрипционной активности гена *TaDHN19.3* на реализацию программы стресс-сигналинга и адаптации, а также на возможность повышения устойчивости растений к биотическим и абиотическим стрессам.

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 // Biochemistry and molecular biology of plants. – 2000. – P. 1158–1249.
3. Kratsch, H. A. The ultrastructure of chilling stress / H. A. Kratsch, R. R. Wise // Plant Cell Environ. – 2000. – Vol. 23. – P. 337–350.
4. Beck, E. Streß bei Pflanzen / E. Beck, U. Lüttge // Biol. Unserer Zeit. – 1990. – Vol. 20. – P. 237–244.
5. Рогожин В. В. Peroксидаза как компонент антиоксидантной системы живых организмов / В. В. Рогожин // СПб.: ГИОРД, 2004. – 240 с.
6. Thomashow, M. F. Plant cold acclimation: freezing tolerance genes and regulatory mechanisms / M. F. Thomashow // Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. – 1999. – Vol. 50. – P. 571–599.
7. Kosova, K. Role of dehydrins in plant stress response / K. Kosova, I. T. Prasil, P. Vitamvas // Handbook of Plant and Crop Stress. – 2010. – P. 239–285.
8. Войников, В. К. Физиологический стресс и регуляция активности генома клеток эукариотов / В. К. Войников, Г. Г. Иванова // Усп. совр. биол. – 1988. – Т. 105, № 1. – С. 3–16.
9. Косаківська, І. В. Нові уявлення про структуру та функції стресових білків / І. В. Косаківська, Н. В. Гудкова // Укр. ботан. журн. – 2002. – Т. 59, № 1. – С. 72–74.
10. Vierling, E. The roles of heat shock proteins in plants / E. Vierling // Ann. Rev. Plant Physiol. and Plant Mol. Biol. – 1991. – V. 42. – P. 579–620.
11. Блехман, Г. И. Синтез белка в условиях стресса / Г. И. Блехман // Успехи совр. биол. – 1988. – Т. 103, № 3. – С. 340–353.
12. Kimpel, J. A. Heat shock in plants / J. A. Kimpel, J. L. Key // Trends in Biochem. Sci. – 1985. – Vol. 10, № 9. – P. 353–357.
13. Стрессовые белки растений / В. К. Войников [и др.] // Иркутск: изд-во Ин-та географии СО РАН, 2004. – 129 с.
14. Close, T. J. Dehydrins: Emergence of a Biochemical Role of a Family of Plant Dehydration Proteins / T. J. Close // Physiol. Plant. – 1996. – Vol. 96. – P. 795–803.
15. Dehydrin Gene in Physcomitrella patens Is Required for Salt and Osmotic Stress Tolerance / L. Saavedra [et al.] // Plant J. – 2006. – Vol. 45. – P. 237–249.
16. Дегидрины растений: их структура и предполагаемые функции / Ч. Р. Аллагулова [и др.] // Биохимия. – 2003. – Т. 68, № 9. – С. 1157–1165.
17. Close, T. J. View of Plant Dehydrins Using Antibodies Specific to the Carboxy Terminal Peptide / T. J. Close, R. D. Fenton, F. A. Moonan // Plant Mol. Biol. – 1993. – Vol. 23. – P. 279–286.
18. Close, T. J. Response of Plants to Cellular Dehydration during Environmental Stress / T. J. Close, E. Bray // Rockville: American Society of Plant Physiologists. – 1993. – P. 91–103.
19. Accumulation of Dehydrin-Like Proteins in the Mitochondria of Cereals in Response to Cold, Freezing, Drought and ABA Treatment / G. B. Borovskii [et al.] // BMC Plant Biol. – 2002. – Vol. 2. – P. 1–7.
20. Mueller, J. K. Identification of a Chloroplast Dehydrin in Leaves of Mature Plants /

- J. K. Mueller, S. A. Heckathorn, D. Fernando // Int. J. Plant Sci. – 2003. – Vol. 164. – P. 535–542.
21. Close, T. J. Dehydrins: A Commonalty in the Response of Plants to Dehydration and Low Temperature / T. J. Close // Physiol. Plant. – 1997. – Vol. 100. – P. 291–296.
22. Choi, D. W. The Barley (*Hordeum vulgare* L.) Dehydrin Multigene Family: Sequence, Allele Types, Chromosome Assignment, and Expression Characteristics of 11 Dhn Genes of cv. Dicktoo / D. W. Choi, B. Zhu, T. J. Close // Theor. Appl. Genet. – 1999. – Vol. 98. – P. 1234–1247.
23. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0 / K. Tamura [et al.] // Molecular Biology and Evolution. – 2013. – Vol. 30, № 12. – P. 2725–2729.
24. Thompson, J. D. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice / J. D. Thompson, D. G. Higgins, T. J. Gibson, // Nucleic Acids Research. – 1994. – Vol. 22, № 22. – P. 4673–4680.
25. Basic local alignment search tool / S. F. Altschul [et al.] // J Mol Biol. – 1990. – Vol. 215. – P. 403–410.
26. Генная инженерия растений / Дж. Дрейпер [и др.] // М: Мир. – 1991. – 408 с.
27. Classification and expression diversification of wheat dehydrin genes / Y. Wang [et al.] // Plant Sci. – 2014. – Vol. 214. – P. 113–120.
28. Урбанович, О. Ю. Полиморфизм двух генов, кодирующих дегидрины пшеницы / О. Ю. Урбанович, П. В. Кузмицкая, В. Г. Боровский // Факторы экспериментальной эволюции организмов. – 2019. – № 25. – С. 172–177
29. Трансформация *Nicotiana tabacum* конструкцией, несущей ген *ndb2* из *Arabidopsis thaliana* в антисмысловой ориентации / А. М. Шишлова-Соколовская [и др.] // Сб. науч. тр. «Молекулярная и прикладная генетика». – 2017. – Т. 22. – С. 76–83.
30. 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.
31. Matzke, M. A. Transgene silencing by the host genome defense: implications for the evolution of epigenetic control mechanisms in plants and vertebrates / M. A. Matzke, M. F. Mette, A. J. Matzke // Plant Mol. Biol. – 2000. – Vol. 43, № 2/3. – P. 401–415.
32. Дейнеко, Е. В. Изучение экспрессии гетерологичных и собственных генов у трансгенных растений: на примере *Nicotiana tabacum* L. : дис. ... д-ра биол. наук : 03.00.15 / Е. В. Дейнеко. – Новосибирск, 2004. – 198 с.
33. Improvement of stress tolerance of wheat and barley by modulation of expression of DREB/CBF factors / S. Morran [et al.] // Plant Biotechnology. – 2011. – Vol. 9. – P. 230–249.
34. Overexpression of the transcription factor HvSNAC1 improves drought tolerance in barley (*Hordeum vulgare* L.) / A. M. Al Abdallat [et al.] // Mol Breeding. – 2014. – Vol. 33, № 2. – P. 401–414.
35. DREB/CBF expression in wheat and barley using the stress-inducible promoters of HD-Zip I genes: impact on plant development, stress tolerance and yield / Y. Yang // Plant Biotechnology. – 2020. – Vol. 18. – P. 829–844.
36. Overexpression of MdIAA9 confers high tolerance to osmotic stress in transgenic tobacco / D. Huang [et al.] // Peer J. – 2019. doi: 10.7717/peerj.7935.

A. M. Shishlova-Sokolovskaya¹, E. P. Kvetko¹, P. V. Kuzmitskaya¹, O. Yu. Urbanovich¹, G. B. Borovsky²

DEVELOPMENT OF TRANSGENIC *NICOTIANA TABACUM* PLANTS WITH THE INSERTION OF THE *TADHN19.3* GENE ENCODING WINTER WHEAT DEHYDRIN

¹State Scientific Institution

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

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

e-mail: s_anastasia78@mail.ru

²Federal State Budgetary Institution of Science

“Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences”

132, Lermontov St., 664033 Irkutsk, the Russian Federation

e-mail: borovskii@sifibr.irk.ru

In order to study how the *TaDHN19.3* gene encoding winter wheat dehydrin affects the development of low temperature tolerance, we have created the genetic vector construction pBI121_TaDHN19/EGFP based on the binary vector pBI121. In this construction, the *TaDHN19.3* gene isolated from winter wheat (*Triticum aestivum*), variety Kapylyanka of the Belarusian selection, is located in the fused reading frame with the enhanced green fluorescent protein (EGFP) gene. Using the method of *Agrobacterium*-mediated transformation of leaf discs, the transgenic *Nicotiana tabacum* plants expressing a chimeric gene were obtained using the pBI121_TaDHN19/EGFP genetic vector construction.

Keywords: *Nicotiana tabacum* cv. Petit Havana SR1, the *ndb2* gene, *Triticum aestivum*, *Escherichia coli* dh5a, *Agrobacterium tumefaciens*, the *TaDHN19.3* gene of winter wheat dehydrin, the *EGFP* gene, cold resistance.

Дата поступления статьи: 14 апреля 2020 г.

В. Е. Розенцвейг¹, Е. А. Аксенова², Д. В. Голоенко¹, О. В. Шаблинская², О. П. Шатарнов²,
Т. М. Шатарнова², О. Г. Давыденко²

МОДЕЛЬ ЗАСУХОУСТОЙЧИВОГО СОРТА СОИ ДЛЯ КЛИМАТИЧЕСКИХ УСЛОВИЙ БЕЛАРУСИ

¹Селекционно-семеноводческое предприятие ООО «ЭкоНива-Семена»
Российская федерация, 306513, Курская обл., Щигровский р-н, с. Защитное

²Государственное научное учреждение
«Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси»
Республика Беларусь, 220072, г. Минск, ул. Академическая, 27
e-mail: axenova_elena@mail.ru

Модель сорта включает полудетерминантный или индетерминантный тип роста, раннее начало и большую длительность цветения, наличие придаточных цветковых кистей, небольшую площадь листовой поверхности. При составлении программы гибридизации рекомендуется ориентироваться на сорта с низким коэффициентом регрессии урожайности на индекс среды. Отбор в гибридных популяциях можно проводить по морфотипу, ориентируясь на приемлемое число узлов главного побега на фоне засухи. Отбор в селекционном питомнике рекомендуется проводить по уборочному индексу или по фоновому признаку «масса соломы», поскольку масса семян с деланки имеет слабую наследуемость, особенно в условиях низкого индекса среды. В конкурсном сортоиспытании отдают предпочтение линиям с коэффициентом экологической регрессии урожайности на индекс среды 0,8–0,9, устойчивым к растрескиванию бобов. Организуют экологическое испытание для выявления линий со стабильной урожайностью.

Ключевые слова: соя, засухоустойчивость, гибридизация, сорт, DREB, дефицит увлажнения.

Введение

Соя, происходя из Восточной Азии, является растением муссонного климата. В Дальневосточном регионе, где она сформировалась как сельскохозяйственная культура, большая часть осадков выпадает во второй половине лета. Этот период совпадает с фенологической фазой налива бобов, максимальным развитием зеленой массы и значением транспирации. Как известно, особенностью зернобобовых культур является наличие критических периодов водопотребления, когда растения обладают повышенной чувствительностью к дефициту влаги. Эти периоды являются лимитирующими для формирования урожая зерна. В южной части Беларуси, где и сосредоточены посевы сои, преобладают почвы легкого гранулометрического состава. Умеренный дефицит влагообеспеченности посевов наблюдается примерно каждый второй год, а острый дефицит — раз в 4–5 лет. Чаще всего недостаток влаги приходится на критические фазы развития сои — цветение и налив зерна,

что приводит к снижению урожайности и сборов зерна сои.

Беларусь, с годовым количеством осадков 560–770 мм, в том числе до 400 мм за «теплый сезон» (апрель – сентябрь), считается регионом с достаточным увлажнением. Однако максимум осадков приходится на первую половину лета, а в июле – августе их количество снижается. Соя чаще испытывает недостаток влаги во второй половине вегетации, что выражается в снижении тургора, абортивности цветков и опадении нижних листьев. В засушливые годы общее количество осадков за теплый период снижается до 150–300 мм. Каждый четвертый – пятый год характеризуется по крайней мере одним засушливым месяцем с менее чем 30 мм осадков. На супесчаных и торфяно-болотных почвах, преобладающих в Полесском регионе, рост растений и развитие бобов угнетаются уже после 10 дней без дождя. Такие опасные периоды наблюдаются по 3–4 раза в году, их продолжительность составляет от 14 до 18 дней, увеличиваясь к югу.

В результате мелиорации Полесской низменности, проведенной в 1960-70-х годах, частота засух в августе в южной Беларуси существенно возросла, а количество осадков, выпадающих за август, сократилось на 10–30 мм [1, 2]. Поэтому проблема засухоустойчивости сои в фазе вегетации «цветение – созревание» имеет важное значение для нашей страны.

Генетика сигнальных путей повышения осмотолерантности

В процессе своего роста и развития растения сталкиваются с изменениями условий окружающей среды, включая абиотические стрессы (изменения температурного режима: холод или жара, засоление почвы, засуха), соответственно, в процессе эволюции вырабатываются защитные механизмы реакции растительного организма. Адаптация и выживание в условиях стресса зависит от успешной работы регулярной системы в целом, начиная с регуляции транскрипции целого комплекса генов, отвечающих за запуск и отладку физиолого-биохимических механизмов, обеспечивающих стабильность существования и выживаемость растения в условиях стресса.

На рисунке 1 представлена схема участия белок-кодирующей системы клетки в регуляции реакции на абиотический стресс.

Важным для растения является поддержание осмотолерантности. Такие разные, казалось бы, условия, как засуха, засоление почвы или низкие температуры, сопровождаются осмотическим стрессом для растения. Для поддержания осмотического баланса при засухе минимизируется потеря воды путем испарения через устьица и кутикулу и увеличение «добычи» влаги благодаря перестройке корневой системы, а также корректировке осмотического метаболизма, который является ключевым при солевом стрессе [4].

Основными подходами к изучению устойчивости к дегидратации являются [5]:

- исследование толерантных семян или выживших растений;
- анализ мутаций на модельных объектах, таких как, например, *Arabidopsis thaliana*;
- анализ эффектов в полевых условиях.

Важнейшим в реакции на стресс является регуляция экспрессии генов на уровне транскрипции [6].

При осмотическом стрессе индуцируется экспрессия транскрипционных факторов (TFs), которые взаимодействуют с цис-регуляторными элементами (CREs), запускающими экспрессию генов реакции на стресс [7]. В промоторной области генов, индуцируемых низкими температурами и засухой, находится «TACCGACAT»



Рис. 1. Схема регуляции реакции на абиотический стресс [3]

DRE-последовательность (от dehydration-responsive element — элемент ответа на дегидратацию). Цис-активные элементы с С-повторами (CRT), которые регулируют реакцию растения на низкую температуру (low-temperature-responsive element — *LTRE*), содержат коровый мотив CCGAC. Транскрипционные факторы связываются с цис-регуляторными последовательностями с помощью консервативного ДНК-связывающего домена, обозначаемого AP2/ERF (APETALA2/ethylene-responsive-factor — этилен чувствительный фактор) [8]. Sakuma с соавторами показали, что нуклеотидные замещения в TACCGACAT последовательности *DRE* локуса на AGCCGCCAT со вставкой GCC могут повлиять на эффективность связывания DREB белком (dehydration-responsive element-binding protein) — связывающимся с элементом ответа на дегидратацию. Самым важным для эффективности и специфичности связывания DREB факторов с ДНК является A/GCCGAC коровый сиквенс. Также в ДНК-связывающем домене (ERF/AP2 домене) DREB фактора консервативными являются наличие валина в позиции 14 (V14) и глутаминовой кислоты в позиции 19 (E19). Однако мутация, при которой вместо глутаминовой кислоты в позиции 19 (E19) появляется аспарагиновая кислота (D19), не влияет на специфичность связывания с *DRE* локусом, но влияет на распознавание GCC мотива (AGCCGCCAT). Тогда как замена валина на аланин в позиции 14 приводит к тому, что мутантный белок DREB1A(AE) не связывается

с *DRE* локусом [8]. На рисунке 2 показана модель передачи сигналов транскрипционными факторам при разных видах стресса. DREB1 фактор связывается с *DRE* последовательностью в промотере гена *rd29A* при холодном стрессе, а фактор DREB2 связывается с этой же последовательностью при засухе или засолении. ERF белок взаимодействует с GCC боксом и запускает этилен-индуцированную экспрессию генов. Крупными буквами указаны консервативные аминокислотные позиции в ERF/AP2 ДНК-связывающем домене: валин (V) и глутаминовая кислота (E) для DREB и аланин (A) и аспарагиновая кислота (D) для ERF [8].

Изучение сравнительной экспрессии транскрипционных факторов DREB2A у арабидопсиса и GmDREB2A у сои на культуре протопластов с помощью микрочипов показало сходство данных белков и наличие нуклеотидной последовательности ACCGAC, комплементарной GTCGGT для *DRE* коровой последовательности (A/GCCGAC). Однако были представлены и другие *DRE* последовательности (GCCGAC), а также частичный *DRE* мотив (CCGACT и CCGACC). Для гена *GmDREB2A* наиболее частыми были GCCGAC, GTCGGT, и ACCGAC последовательности [9].

Мы провели исследование контрастных по засухоустойчивости сортов сои. Во всех сиквенсах для гена *GmDREB2*, кодирующего канонический для ответа на засуху транскрипционный фактор [9], выявлена последовательность CACGTG, характерная для GCC бокса. Также

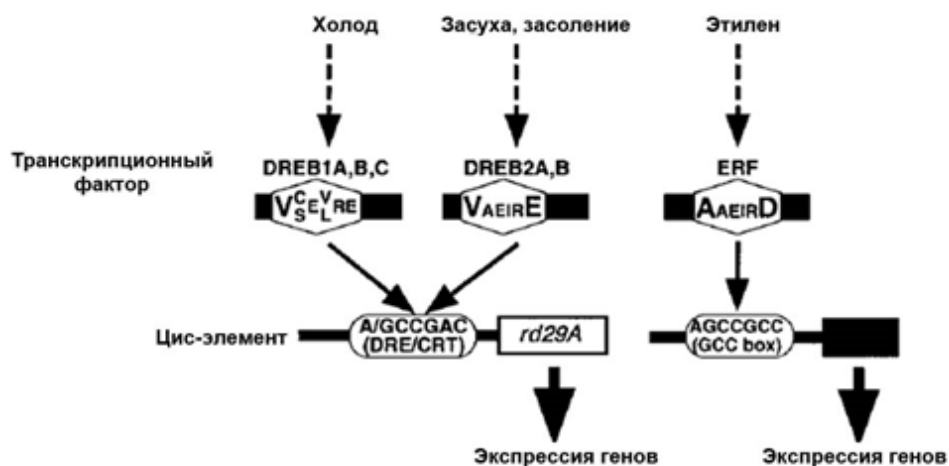


Рис. 2. Модель передачи сигналов транскрипционными факторами при разных видах стресса [8]

для большинства незасухоустойчивых форм и одной засухоустойчивой была обнаружена последовательность TGGCTG, комплементарная коровой последовательности ACCGAC в сайте связывания с регуляторным элементов DRE. Коровый мотив VAEIRL, связывающийся с промотерной DRE последовательностью при запуске экспрессии генов реакции на засуху [8], был выявлен у большинства засухоустойчивых форм и одной незасухоустойчивой, хотя нуклеотидные последовательности (GTCGCTGAAATCAGACTC), соответствующие данной аминокислотной, были выявлены во всех проанализированных сиквенсах по гену *GmDREB2* (рис. 3).

Подбор материала для селекции сои на засухоустойчивость

Основными блоками работы селекционера являются создание генетического разнообразия («из чего отбирать»), обоснование модели сорта («что отбирать») и методы оценки и отбора («как отбирать») [10]. Среди сортов сои белорусской селекции самым стабильным в условиях недостаточного увлажнения является Припять [11]. На супесчаных почвах

Лунинецкого и Лельчицкого районов этот сорт показывает прибавки урожайности к стандартам на уровне 10–15% при низких индексах среды, обусловленных дефицитом осадков. Многие сорта кубанской селекции являются хорошими источниками засухоустойчивости. Это, например, Вилана и Весточка селекции ВНИИМК; Спарта, Селекта 302 и Арлета селекции компании «Соевый комплекс». Работа по повышению засухоустойчивости давно проводится на Ершовской ОСОЗ Саратовской области [12]. Из созданных там сортов можно отметить Соер 6, Соер 7 и Самер 2. Хорошо проявили себя в условиях засухи сорта Белгородская 7 (+11% к стандарту Оресса), Казачка (+12%) и Вейделевская 17, созданные в Центрально-черноземном регионе РФ. Из украинских сортов по урожайности на фоне засухи выделяются Золотиста, Устя и Романтика. Недостатком сорта Золотиста является твердосемянность в годы с жаркой погодой во время налива зерна, недостатком сорта Романтика — полегание во влажные годы. В программе гибридизации нами активно использовался французский сорт Adoc, который показал себя как донор засухоустойчивости,

4nz4DREB2	-----SFLLP
1z3DREB2	HWGKWVAEIRLPKNRTRLWLGTFTAEAAALAYDNAAFKLRGEFARLNFPHLRHHGAF
3z3DREB2	HWGKWVAEIRLPKNRTRLWLGTFTAEGAALAYDNAAFNLFPSSQCLNFPHLRHHG---
4z3DREB2	HWGKWVAEIRLPKNRTRLWLGTFTAEEXLAYDNAAFKLRGEFARLNFPHLRHHG---
5z4DREB2	HXGKWVAEIXLPKNRTRLXLGTFTAEAAALAYDNAAFKLQASSFVSIFLIDTTE----
DREB2prot	HWGKWVAEIRLPKNRTRLWLGTFTAEAAALAYDNAAFKLRGEFARLNFPHLRHHGAF
5nz2DREB2	HWGKWVAEIRLPKNRTRLWLGTFTAEAAALAYDNAAFKLRGEFARLNFPHLRHHGAF
2nz2DREB2	TALGCVGRNQTFKEPHAPLARNIRHRRGSSIS-VQRSEVACRFVRASQFSSSKTFRSLI
202DREB2	TALGCVGRNQTFKEPHAPLARNIRHRRGSSIS-VQRSEVACRFVRASQFSSSKTFRSLI
2z3DREB2	TALGCVGRNQTFKEPHAPLARNIRHRRGSSIS-VQRSEVACRFVRASQFSSSKTFRSLI
301DREB2	TALGCVGXNQTFKEPHAPLARNIRHRRGSSIS-VQRSEVACRFVRXSQFSSSKTFRSLI
6z1DREB2	TALGCVGRNQTFKEPHAPLARNIRHRRGSSIS-VQRSEVALGEFARLNFPHLRHHG---
201DREB2	TALGCVGXNQTFKEPHAPLARNIRHRRGSSIS-VQRSEVACRFVRASQFSSSKTFRSLI
302DREB2	GASGSLKSDSQRTARASGEHSTFQRKQHRITT-QRLSSEASSFVSIFLIDTTEFSFSAI
3nz3DREB2	GASGSLKSDSQRTARASGEHSTFQRKAALAYD-NAAFKLRGEFARLNFPHL-----
6nz1DREB2	GASGSLKSDSQRTARASGEHSTFQRKQHRITT-QRLSSEASSFVSIFLIDTTEPRF---
4nz4DREB2	GASGSLKSDSQRTARASGEHSTPAEEAALAYDTQRLSSEASSFVSIFLIDTTEFSFSAI
1z3DREB2	CFASVEGCFENGFFDICGCFAEITRXLFILGSEIRGSSFCGLIV

Рис. 3. Пример выравнивание аминокислотных последовательностей *GmDREB2* контрастных по засухоустойчивости сортов/линий сои

также в скрещивания вовлекались итальянские сорта Bahia и Selina, которые по данным сортоиспытания Италии лидируют при низком индексе среды с прибавкой в урожайности 15–18% [13]. Относительно слабой засухоустойчивостью обычно характеризуются китайские, дальневосточные, канадские и ряд новых французских сортов. Это объясняется климатическими условиями (муссонный климат Восточной Азии, стабильно высокий гидротермический коэффициент восточных провинций Канады) или же селекцией для условий орошения на юге Франции.

После создания генетической вариации проводится отбор в расщепляющихся популяциях. На ранних этапах селекционного процесса ($F_2 - F_5$), когда оценки урожайности невозможны или необъективны в силу их искажения средовыми «шумами» [15], селекционер работает, полагаясь во многом на визуальные оценки. И здесь немаловажно разработать модель сорта, опираясь на которую можно улучшить эффективность работы в ранних поколениях.

Засухоустойчивость сои как составляющая модели сорта детально изучалась во Всероссийском НИИ масличных культур (г. Краснодар). Баранов В. Ф. с соавторами [16] отмечают критическое значение увлажнения в фазе налива бобов для формирования урожая: для среднеспелых сортов с периодом вегетации 120–130 суток коэффициент корреляции урожайности с количеством осадков в первой половине лета составил от 0,46 до 0,49, а во второй половине – от 0,87 до 0,94. Отмечена наиболее тесная зависимость урожая среднеспелых сортов от суммы осадков за июль – август, поскольку это совпадает с их генеративными фазами, тогда как зависимость от июньских осадков меньше ($r = 0,25$) [17]. Структура вегетационного периода в связи с засухоустойчивостью была проанализирована М. В. Мирошниченко на сортах селекции ВНИИМК. Современные сорта характеризовались самым коротким периодом «всходы – цветение» (в среднем 42 дня) по сравнению с сортами 1930–1980-х гг. (44–48 дней). В то же время цветение новых сортов было более продолжительным (37 дней), несмотря на их раннеспелость. Говоря о модели сорта сои, М. В. Мирошниченко

отмечает, что в условиях недостаточного увлажнения преимущество имеют сорта с укороченным межфазным периодом «всход – начало цветения» (30–35 дней), а для обеспечения высокой и стабильной урожайности семян общая продолжительность периода цветения должна находиться в пределах 38–45 дней [18]. Высокую засухоустойчивость новых сортов селекции ВНИИМК связывают с их высокорослостью, поскольку ей сопутствует и хорошее развитие корневой системы, способной доставать влагу из глубоких слоев почвы, что недоступно для низкорослых сортов сои. В то же время отмечается, что малой степенью засухоустойчивости обладают формы корейского подвида [17]. По нашему мнению, это связано с тем, что многие из них обладают детерминантным типом роста в сочетании с поздним наступлением цветения. По данным Романцовой И. Е., в Центрально-черноземной зоне России детерминантные сорта с фиксированным количеством узлов и скоротечным периодом формирования бобов являются более уязвимыми к средовым факторам, тогда как индетерминантные сорта чрезмерно затягивают цветение во влажные годы [19].

У некоторых сортов сои имеются придаточные пазушные кисти, развивающиеся в продуктивных узлах через 7–10 дней после начала цветения основной кисти и образующие вторую волну цветения [20]. Наличие и степень выраженности придаточных кистей коррелирует с урожайностью ($r = 0,42$, $P < 0,01$) [21]. Такой селекционный материал ценен для избегания экологических стрессов (засуха или низкие ночные температуры), вызывающих абортивность завязей. А. Б. Дьяков и Т. А. Васильева, проанализировав сорта сои Кубани, считают целесообразным селекционно-генетическое снижение площади листовой поверхности до 3 м² на 1 м² почвы, что достаточно для эффективного фотосинтеза, и позволит избежать большой потери влаги растениями при усиливающемся дефиците обеспечения влаги во второй половине вегетации, когда налив зерна требует интенсивной транспирации. Этот селекционный сдвиг должен сопровождаться повышением ксероморфности листьев [22].

Путем регрессионного и дисперсионного анализа четырехлетних данных урожайнос-

ти 89 коллекционных сортов сои нами были установлены характеристики стабильности урожайности в разрезе их типов роста и групп спелости. Согласно полученным нами данным, полудетерминантные сорта обладают более низкими значениями коэффициента регрессии урожайности на экологический индекс b , нежели индетерминантные. Иными словами, угол наклона линии регрессии и, соответственно, потенциал урожайности у них меньше. Свободный член уравнения a у полудетерминантных сортов в среднем выше, а компенсационный эффект $K_g < 1$, что предполагает более высокую урожайность в неблагоприятных условиях (например, во время засухи). Действительно, парная корреляция типа роста и засухоустойчивости, рассчитанная по выборке полу- и индетерминантных сортов, составила $-0,19^*$, т. е. первые были несколько более засухоустойчивы.

Однофакторный дисперсионный анализ также показал статистически значимое на уровне $\alpha < 0,03$ влияние типа роста на стабильность. Комплексная оценка общей адаптивной способности и стабильности генотипа, выраженная через показатель селекционной ценности генотипа (СЦГ), у полу- и индетерминантных сортов статистически не различалась. Индетерминантные сорта, благодаря нефиксированному числу узлов в начале репродуктивной фазы, способны проявлять большую отзывчивость на улучшение условий среды в течение этой фазы вегетации. Отзывчивость полудетерминантного морфотипа ограничена в силу большей степени терминации роста. Вероятно, полудетерминантный тип роста несколько лучше приспособлен к экстенсивным условиям возделывания и может обеспечить большую стабильность урожаев сои. Индетерминантный тип роста связан с большей пластичностью и перспективен при интенсивной агротехнике, обладая более высоким потенциалом урожайности [23].

Детерминантные сорта достоверно уступили прочим сортам по СЦГ, урожайности и общей адаптивной способности. По стабильности же эта группа неоднородна. Раннеспелые образцы с детерминантным типом роста имеют невысокие значения b , однако их поведение — это не столько стабильность, сколько низкая потенциальная урожайность, что обусловлено,

главным образом, их низкорослостью. Позднеспелые детерминантные сорта достаточно высокорослы, но их урожайность крайне нестабильна в силу позднего начала цветения. Детерминантный сорт, по определению, зацветает, лишь сформировав все продуктивные узлы, поэтому для достижения приемлемой высоты растения и числа узлов он должен зацвести поздно. Очевидно, что позднее начало цветения увеличивает вероятность попадания растения под стресс дефицита осадков, который обычно развивается во второй половине вегетации. Поэтому в целом мы не рекомендуем отбирать детерминантные линии при селекции на засухоустойчивость.

Отбор в селекционном питомнике

Селекционный питомник (СП) представляет собой потомства элитных растений, отобранных в гибридных популяциях F_4 , высеянные однорядковыми делянками. В разных селекционных центрах объем СП варьирует от 3 до 20 тысяч линий. На этом этапе селекции оценка урожайности также затруднена вследствие краевых эффектов, маленькой площади делянки и отсутствия повторностей. Отбор обычно проводят визуально, сравнивая с ближайшими стандартами, которые размещают через 10 номеров.

В условиях низкого агрофона эффективность отбора на урожайность падает. На фоне острой засухи при уровне урожайности 0,8 т/га проводят отбор в селекционном питомнике по параметрам архитектоники растения: индетерминантного типа роста, ветвистости и числа узлов главного стебля. Способность генотипа сохранять приемлемое число узлов главного побега (11–12) на фоне засухи обычно говорит о его толерантности к этому виду стресса. Таким образом, визуальный отбор по морфотипу, хотя и не заменяет полностью отбор по продуктивности, может быть использован в условиях, неблагоприятных для оценки продуктивности и ведения отбора.

Исследования, проводившиеся во ВНИИМК (г. Краснодар) показали, что в условиях засухи отбор в селекционном питомнике по уборочному индексу более эффективен, нежели по массе семян с делянки [24]. Масса семян в СП имеет низкую наследуемость,

поскольку искажается рядом экологических факторов, перечисленных выше. Трунова М. В. и Кочегура А. В. сделали вывод, что уборочный индекс имеет более высокую и устойчивую связь с урожайностью на заключительных этапах селекции. Кроме того, варьирование уборочного индекса было в 1,6 раза ниже, чем таковое для массы семян с делянки [24].

Масса соломы (стебли со створками бобов) использовалась как фоновый признак для сои в работе А. А. Ткачевой [25]. В.М. Лукомец с соавторами показали хорошую дискриминационную способность коррекции по массе соломы в сочетании с разреженным ценозом в условиях Краснодара [26]. Возможно, это объясняется тем, что при более высоком уровне селекционной проработки культуры в I группе спелости (в отличие от 00–000 групп) общая сухая биомасса приближается к биологическому пределу. Вариация общей биомассы в этом случае имеет экологическую природу, что соответствует требованию к фоновому признаку. Прогресс же селекции достигается за счет уборочного индекса, характеризующего в южной России засухоустойчивость во второй половине вегетации и являющегося надежным критерием ($R^2 = 0,95$) для отбора адаптивных генотипов [27].

По существу, последние два подхода аналогичны. При работе с материалом по методу фоновых признаков отбирают генотипы, находящиеся выше линии регрессии целевого признака (продуктивность) на фоновый (в данном случае — масса соломы). Это и есть генотипы, обладающие более высоким уборочным индексом, т. е. отношением массы зерна к общей сухой биомассе.

В 2019 году нами был заложен эксперимент в защищенном грунте по изучению физиологических параметров засухоустойчивости: удельная транспирация, индекс листовой поверхности, удельная плотность листовой пластинки, эффективность использования воды, реакция общей биомассы, уборочного индекса и урожайности на водный стресс. Для двухфакторного эксперимента, по данным полевых наблюдений за предшествующие годы, отобрано 3 сорта: Припять — со стабильной урожайностью, Полесская 201 и Kalmit — с нестабильной (представлены в таблице).

Фактор увлажнения имеет 2 градации: достаточное (1,0 л/сосуд/сут.) и дефицитное (0,4 л/сосуд/сут.) водоснабжение. Эта поливная норма рассчитана из следующих данных: 100 мм осадков/месяц = 100 л/м² х месяц = 3 л/м² х сут. = 0,75 л/сосуд х сут. Сорта посеяны по 4 растения в сосуд, по 5 повторностей (сосудов). Предусмотрена периодическая ротация сосудов для равномерного освещения.

Для измерения транспирации поверхность почвы в сосудах укрывают фольгой, кроме того, сравнивают потерю массы сосуда с растениями и сосуда с почвой (без растений). Получены и проанализированы данные эксперимента по физиологии засухоустойчивости в закрытом грунте. Изученные показатели приведены ниже.

Площадь листовой поверхности на кв. метр (leaf area index, **LAI**) — определяли по соотношению масс листьев и высечек из листьев, высушенных до воздушно-сухого состояния. Удельная плотность листьев (specific leaf weight, **SLW**) — отношение массы листьев к площади листьев — показатель ксероморфности.

Удельная транспирация (**Tr**) — потеря массы сосудом за сутки, отнесенная к площади листьев.

Общая надземная биомасса (total dry mass, **TDM**): побеги + листья + бобы (воздушно-сухая).

Чистая продуктивность фотосинтеза (net photosynthesis, **Pn**) — отношение биомассы к площади листьев, за определенный интервал времени.

Приблизительно рассчитывается, $Pn \sim$ общая биомасса (**TDM**) / (вегетационный период (**ПВ**) х $\frac{1}{2}$ полной площади листьев).

Эффективность водопотребления (water use efficiency, **WUE**) — отношение ЧПФ к транспирации — биомасса, произведенная на 1 л потребленной воды: $WUE = Pn / Tr$.

Накопление биомассы за вегетационный период (crop growth rate, **CGR**). $CGR =$ общая биомасса (**TDM**) / вегетационный период (**ПВ**)

Урожай зерна на фоне оптимального (Y_{opt}) и дефицитного (Y_{def}) увлажнения.

Уборочный индекс (**УИ**) — отношение урожая зерна к общей биомассе, а также на фоне оптимального ($УИ_{opt}$) и дефицитного ($УИ_{def}$) увлажнения: $УИ = Y / TDM$.

Таблица

Физиологические параметры засухоустойчивости

Сорт	LAI, м ² /м ²	SLW, г/м ²	Tr, г/(м ² х ч)	Pn, г/(м ² х ч)	WUE, г/л	Y _{opt} , г/раст.	Y _{def} , г/раст.	УИ _{opt} , %	УИ _{def} , %
Припять	2,02	39,70	220	0,17	0,78	5,00	2,75	39	37
Kalmit	4,14	39,70	136	0,15	1,21	3,50	1,75	25	18
Полесская 201	2,04	44,10	227	0,24	1,06	2,75	2,50	25	23

Наибольшей продуктивностью при обеих градациях фактора увлажнения обладал сорт Припять. Однако стабильной продуктивностью характеризовался сорт Полесская 201: снижение его урожайности на фоне искусственной засухи было наименьшим.

Однозначно связать физиологические показатели с этим целевым параметром затруднительно. Тем не менее сорт Полесская 201 обладал наибольшей ксероморфностью (удельной плотностью) листовых пластинок и чистой продуктивностью фотосинтеза. По эффективности водопотребления выделился сорт Kalmit, однако в нашем эксперименте он был самым нестабильным по продуктивности.

Нами показано, что корреляция урожайности с продолжительностью периода «всходы – цветение», обычно статистически незначимая, становится отрицательной ($-0,23$) и значимой ($P = 0,01$) в годы с дефицитом осадков в июле – августе. Эти годы характеризовались и значительным снижением средней урожайности (с 2,5 до 1,7 т/га) по причине засухи. Изучено также поведение элементов структуры урожайности в годы с дефицитом увлажнения во второй половине вегетации. Анализ многолетних данных показал, что корреляция урожайности с числом узлов главного побега обычно составляет от +0,50 до +0,65 и высоко достоверна. Однако в засушливые годы она падает до недостоверного значения +0,12. Аналогично масса 1000 семян в благоприятные годы проявляет положительную связь с урожайностью, хотя и невысокую (+0,12...+0,30), а в засушливые годы снижается до незначимой 0,05.

Таким образом, генотипы, адаптированные к засушливым условиям, должны обладать ранним началом и большой продолжительностью цветения, образовывать большое количество относительно мелких семян, формировать

относительно небольшое число продуктивных узлов (в отличие от интенсивных сортов, для которых важна способность наращивать максимальное число узлов для полного использования ресурсов среды, разумеется, при устойчивости к полеганию).

Конкурсное и экологическое испытания

На последних этапах селекционного процесса материал получает статистически достоверные оценки в предварительном и конкурсном сортоиспытаниях. Питомники закладывают многорядковыми делянками большой площади в повторностях, что позволяет нивелировать краевые эффекты, пестроту плодородия почвы и прочие источники средовой вариации. В конкурсном сортоиспытании проводят регрессионный анализ полученных данных для выявления линий с низким коэффициентом экологической регрессии урожайности на индекс среды (среднюю урожайность всех линий в опыте). Оптимальным для отбора стабильных линий является значение b_i около 0,8–0,9; более низкие значения говорят о существенном недостатке потенциала урожайности. Необходимо продолжать испытание линий со стабильной урожайностью, даже если их средняя урожайность за 2–3 года не выше стандарта. При уборке оценивают растрескивание бобов и осыпание зерна при перестое по пятибалльной шкале.

По возможности организуют экологическое сортоиспытание в нескольких географических точках, благоприятных для оценки засухоустойчивости (легкие почвы, низкий индекс среды). Его можно закладывать в формате конкурсного или, если это технически затруднительно, производственного испытания ряда агрофонов, в которых переменными среды являются полив, срок посева, плотность стеблестоя и другие факторы.

Заключение

В результате проведенных исследований нами предложены следующие методические рекомендации по технологии селекции сои на засухоустойчивость. При подборе компонентов скрещиваний следует ориентироваться, в первую очередь, на сорта Припять, Adoc, Золотиста, Белгородская 7, Соер 7, Самер 2, Вилана, Спарта, а также на другие сорта селекционеров, где проводится работа над этим параметром. При изучении коллекции исходного материала нужно уделять внимание оценке образцов в засушливые годы и статистическому анализу полученных данных. Рекомендуем проводить поиск генотипов с низким значением коэффициента экологической регрессии урожайности на индекс среды (0,8–0,9). В гибридных популяциях необходимо применять коррекцию продуктивности растений по фоновому признаку «масса соломы». В условиях острой засухи требуется проводить визуальный отбор по числу узлов главного побега. В селекционном питомнике следует отбирать линии с высоким уборочным индексом, невысокими значениями площади листовой поверхности, ранним и продолжительным цветением, полудетерминантным или индетерминантным типом роста, придаточными пазушными кистями, устойчивые к осыпанию зерна. Также важно уделять должное внимание организации экологического сортоиспытания для оценки линий в разных географических точках и в разные годы и выявления линий со стабильной урожайностью в широком спектре условий.

Работы выполнены по мероприятию 7 ГП «Наукоемкие технологии и техника» на 2016–2020 годы подпрограмма 1 «Инновационные биотехнологии — 2020».

Список использованных источников

1. Логинов, В. Ф. Климат Беларуси – Мн.: Институт геологии, 1996. – 235 с.
2. Логинов, В. Ф. Последствия современных изменений климата в Беларуси // Земляробства і ахова раслін. – 2004. – № 5. – С. 3–4.
3. Khan, Z. H. Transcriptional regulatory network of cis-regulatory elements (cres) and transcription factors (tfs) in plants during abiotic stress / Z. H. Khan [et al.] // Int. J. Plant. Biol. Res. – 2017. – Vol. 5, № 2. – P. 1064–1082.
4. Chinnusamy, V. Molecular genetic perspectives on cross-talk and specificity in abiotic stress signalling in plants / V. Chinnusamy, K. Schumaker, J. K. Zhu // J. Exp. Bot. – 2004. – Vol. 55, № 395. – P. 225–236.
5. Ingram, J. The Molecular Basis of Dehydration Tolerance in Plants / J. Ingram, D. Bartels // Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. – 1996. – Vol. 47. – P. 377–403.
6. Shinozaki, K. Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and cross-talk between two stress signaling pathways / K. Shinozaki, K. Yamaguchi-Shinozaki // Curr. Opin. Plant Biol. – 2000. – Vol. 3. – P. 217–223.
7. Narusaka, Y. Interaction between two Cis-acting elements, ABRE and DRE, in ABA-dependent expression of Arabidopsis rd29A gene in response to dehydration and high-salinity stresses / Y. Narusaka [et al.] // Plant J. – 2003. – Vol. 34. – P. 137–148.
8. Sakuma, Y. DNA-binding specificity of the ERF/AP2 domain of Arabidopsis DREBs, transcription factors involved in dehydration and cold-inducible gene expression / Y. Sakuma [et al.] // Biochem Biophys Res Commun – 2002. – Vol. 290. – P. 998–1009.
9. Mizoi, J. GmDREB2A;2, a canonical DEHYDRATION-RESPONSIVE ELEMENT-BINDING PROTEIN2-type transcription factor in soybean, is posttranslationally regulated and mediates dehydration-responsive element-dependent gene expression / J. Mizoi [et al.] // Plant Physiol. – 2013. – Vol. 161, № 1. – P. 346–361.
10. Что такое модель сорта? / Коваль С. Ф. [и др.] – Омск: Изд-во ФГОУ ВПО ОмГАУ, 2005. – 280 с.
11. Селекционная компания «Соя-Север Ко.» [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://sever.by>. – Дата доступа: 06.12.2019.
12. Мордвинцев, М. П. Селекция сои для условий Поволжья : автореф. дис. ... д-ра с.-х. наук : 06.01.05 / М. П. Мордвинцев : Пензенская гос. с.-х. академия. – Пенза, 2008. – 46 с.
13. S.I.S. Società Italiana Sementi S.p.A. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: . – Дата доступа: 06.12.2019.

14. CGS Sementi SpA [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.cgssementi.it>. – Дата доступа: 06.12.2019.
15. Драгавцев, В. А. Новые принципы отбора генотипов по количественным признакам в селекции растений / В. А. Драгавцев // Генетика количественных признаков сельскохозяйственных растений. – М.: «Наука», 1978. – С. 5-9.
16. Баранов, В. Ф. Отзывчивость различных сортов сои на уплотнение агроценоза в широкорядном посеве / В. Ф. Баранов, А. Г. Ефимов, У. Т. Корреа // Повышение продуктивности сои : сб. науч. тр. – Краснодар, 2000. – С. 104–108.
17. Соя: биология и технология возделывания / под ред. В. Ф. Баранова и В. М. Лукомеца. – Краснодар, 2005. – 434 с.
18. Мирошниченко, М. В. Изменение хозяйственно-биологических признаков сои в результате селекции : автореф. дис. ... канд. биол. наук : 06.01.05 / М. В. Мирошниченко ; ВНИИМК. – Краснодар, 2005. – 25 с.
19. Романцова, И. Е. Степень проявления количественных признаков сои в условиях юго-запада ЦЧЗ и разработка модели нового сорта : автореф. дис. ... канд. с.-х. наук : 06.01.05 / И. Е. Романцова; Белгородская гос. с.-х. акад. – Воронеж, 2005. – 26 с.
20. Gass, T. Cold tolerance of soybean during the reproductive phase / T. Gass [et al.] // Eur. J. Agron. – 1996. – Vol. 5. – P.71-88.
21. Goloenko, D. V. Soybean breeding in Belarus / D. V. Goloenko, V. E. Rosenzweig, O. G. Davydenko // Legume Perspectives. – 2013. – Vol. 1. – P. 35–36.
22. Дьяков, А. Б. Взаимосвязи признаков продуктивности и адаптивности сортов сои при разных типах погоды юга России / А. Б. Дьяков, Т. А. Васильева // Масличные культуры. – 2009. – Вып. 140. – С. 68–79.
23. Розенцвейг, В. Е. Исходный материал и селекционно-генетическое обоснование модели сорта сои для условий Беларуси : автореф. дис. ... канд. биол. наук : 06.01.05 ; 03.00.15 / В. Е. Розенцвейг. – Минск, 2007. – 20 с.
24. Трунова, М. В. Возможность повышения точности оценок урожайности селекционного материала сои в ранних питомниках / М. В. Трунова, А. В. Кочегура // Масличные культуры. – 2016. – Вып. 167. – С. 9–15.
25. Ткачева, А. А. Сравнение эффективности критериев отбора на повышение продуктивности сои на разных этапах селекционного процесса / А. А. Ткачева // Инновационные направления исследований в селекции и технологии возделывания масличных культур. Мат-лы VI междунар. конф. молодых ученых и специалистов. – Краснодар, 2011. – С. 311–315.
26. Лукомец, В. М. Эффективность отбора в популяциях сои при использовании разных критериев и схем размещения растений / В. М. Лукомец, А. В. Кочегура, А. А. Ткачева // Масличные культуры. – 2012. – Вып. 151–152. – С. 44–48.
27. Дьяков, А. Б. Оценка потенциалов урожайности и засухоустойчивости сортов сои / А. Б. Дьяков, М. В. Трунова, Т. А. Васильева // Масличные культуры. – 2009. – Вып. 141. – С. 78–86.

V. E. Rosenzweig¹, E. A. Aksyonova², D. V. Goloenko¹, O. V. Shablinskaya², O. P. Shatarnov²,
T. M. Shatarnova², O. G. Davydenko²

SOYBEAN DROUGHT RESISTANT CULTIVAR MODEL FOR THE CLIMATIC CONDITIONS OF BELARUS

¹Breeding and Seed-production Enterprise LLC “EkoNiva-Semena”
the Russian Federation, 306513 Zashchitnoye Settlement, Shchigrovsky District, Kursk Oblast

²State Scientific Institution
“Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus”
27, Akademicheskaya St., 220072 Minsk, the Republic of Belarus
e-mail: axenova_elena@mail.ru

The cultivar model includes semi-determinate or indeterminate growth type, early and extended flowering time, additional lateral flowering buds, and a small leaf surface area. When drawing up a hybridization program, it is recommended to focus on cultivars with a low yield regression coefficient per environmental index. Selection in hybrid populations can be carried out by morphotype, focusing on the acceptable number of nodes of the main shoot against the background of drought. Selection in the breeding nursery is recommended to be carried out according to the harvest index or according to the background character “straw mass”, since “the seed mass from a plot” has weak heritability, especially in conditions of a low environmental index. In competitive cultivar testing, preference is given to lines with an ecological yield regression coefficient per environmental index of 0.8–0.9, resistant to pod shattering. Environmental testing to identify lines with the stable yielding capacity is organized.

Keywords: soybean, drought resistance, hybridization, variety, DREB, deficit of water supply.

Дата поступления статьи: 21 апреля 2020 г.

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

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

Государственное научное учреждение
«Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси»
Республика Беларусь, 220072, г. Минск, ул. Академическая, 27
O.Orlovskaya@igc.by

Изучен минеральный состав зерна линий мягкой пшеницы с интрогрессиями генетического материала других видов рода *Triticum* в сравнении с родительскими формами. Показано, что средние значения содержания макро- и микроэлементов в зерне образцов видов рода *Triticum* были выше, чем у сортов *T. aestivum* (в 1,12–2,46 раза в зависимости от элемента). Линии с чужеродным генетическим материалом, как правило, превосходили исходные сорта мягкой пшеницы, но уступали видам рода *Triticum* по содержанию основных минералов в зерне. Выделены линии, которые по уровню накопления отдельных элементов превышали обоих родителей: 11-1, 13-3 и 16-5 *T. dicoccoides* × Фестивальная по Zn и Mg; 206-2, 208-3 Pitic S62 × *T. dicoccum* к-45926, 1-3 *T. dicoccum* к-45926 × Фестивальная, 16-5 *T. dicoccoides* × Фестивальная — по K и P; 20-1 *T. kiharae* × Саратовская 29, 8 Саратовская 29 × *T. dicoccoides* — по Ca.

Ключевые слова: виды рода *Triticum*, интрогрессивные линии мягкой пшеницы, содержание микро- и макроэлементов в зерне.

Введение

Минеральные элементы играют важную роль в биохимических и физиологических процессах всех живых организмов. У растений многие из них оказывают влияние на рост, развитие, фотосинтез и водный обмен, а в итоге и на продуктивность. Дефицит минералов в организме человека может приводить к ухудшению работы иммунной системы, ослаблению памяти, анемии и другим проблемам со здоровьем. Более 2 млрд людей в мире в той или иной степени испытывают недостаточное поступление с пищей микроэлементов, особенно в районах, где значительную часть рациона питания составляют злаки [1]. Одной из наиболее важных сельскохозяйственных культур, которая играет ключевую роль в обеспечении продовольствием населения во всем мире, является мягкая пшеница (*T. aestivum* L.). В настоящее время для данной культуры отмечена невысокая концентрация многих минеральных элементов в зерне, и, кроме того, в злаках содержатся вещества, которые препятствуют их усвоению (оксалаты, фитин, волокна) [2, 3]. Известно, что дикие и примитивные пшеницы характеризу-

ются более высоким содержанием микроэлементов в сравнении с сортами и селекционными линиями и могут служить источниками генетического разнообразия для минерального состава зерна *T. aestivum* [4–6]. Например, концентрация цинка (Zn) и железа (Fe) в зерне современных сортов составляет в среднем 25 и 35 мг/кг соответственно, в то время как у образцов *T. dicoccoides* — 61 и 46 мг/кг соответственно [7]. С целью обогащения и улучшения генофонда мягкой пшеницы в скрещиваниях с сортами *T. aestivum* L. нами были привлечены образцы видов рода *Triticum* (*T. dicoccoides*, *T. dicoccum*, *T. durum*, *T. spelta*, *T. kiharae*). Проведенное ранее изучение генетического разнообразия коллекции интрогрессивных линий пшеницы с помощью методов С-бэндинга и SSR-анализа показало, что в геноме гибридных линий чужеродный генетический материал представлен как в виде небольших участков, так и в виде целых хромосом (межгеномные замещения) и их фрагментов (центрические и терминальные транслокации) [8, 9]. Цель данного исследования — изучение минерального состава зерна линий мягкой пшеницы с интро-

грессиями генетического материала видов рода *Triticum* в сравнении с родительскими формами.

Материалы и методы

В исследование включены 4 сорта яровой мягкой пшеницы (Рассвет, Саратовская 29, Фестивальная, Pitic S62), тетраплоидные *T. dicoccoides*, *T. dicoccum*, *T. timopheevii* ($2n = 28$) и гексаплоидные *T. spelta*, *T. kiharae* ($2n = 42$) виды рода *Triticum*, а также 20 интрогрессивных линий, полученных в Институте генетики и цитологии НАН Беларуси. В работе использованы линии F_{10} , из которых 7 создано с участием *T. dicoccoides* (29 Рассвет $\times$ *T. dicoccoides* к-5199; 8 Саратовская 29 $\times$ *T. dicoccoides*; 11-1, 13-3, 15-7-1, 15-7-2, 16-5 *T. dicoccoides* $\times$ Фестивальная), 6 — с *T. kiharae* (19, 20-1, 25-2 *T. kiharae* $\times$ Саратовская 29; 28, 34-1, 34-2 *T. kiharae* $\times$ Фестивальная) и 5 — с *T. dicoccum* (1-3, 2-7 *T. dicoccum* к-45926 $\times$ Фестивальная; 206-2, 208-3, 213-1 Pitic S62 $\times$ *T. dicoccum* к-45926), 2 — с *T. spelta* (7 *T. spelta* к-1731 $\times$ Саратовская 29, 1-8 *T. spelta* к-1731 $\times$ Рассвет). Растения выращивали на экспериментальных полях Института генетики и цитологии НАН Беларуси (г. Минск, Республика Беларусь). Минеральные удобрения вносили в следующих дозах: азотные — 80 кг д.в./га, фосфорные — 70 кг д.в./га, калийные — 90 кг д.в./га. Уровень накопления макро-(N, K, P, Ca, Mg) и микроэлементов (Zn, Fe, Cu, Mn) в зерне определяли в Центре аналитических и спектральных измерений Государственного научного учреждения «Институт физики им. Б.И. Степанова НАН Беларуси». Концентрацию азота оценивали на CHNOS - анализаторе VARIO EL фирмы ELEMENTAR, содержание остальных элементов — на атомно-эмиссионном спектрометре IRIS Intrepid II XDL DUO. Для каждого образца анализ проводили в двукратной биологической повторности, измерения повторяли 10 раз для каждой пробы. Результаты эксперимента обобщены с использованием методов описательной статистики и дисперсионного анализа в программных пакетах Statistica 10.0 и MS Excel.

Результаты и обсуждение

Проведен анализ содержания макро- и микроэлементов в зерне родительских сортов мягкой пшеницы и видов рода *Triticum*, а также интрогрессивных линий, получен-

ных с их участием. К основным питательным элементам, необходимым для нормального роста и развития растений относятся: азот (N), калий (K), фосфор (P), магний (Mg), кальций (Ca). Недостаточное количество данных нутриентов приводит к ослаблению фотосинтетической активности, нарушению нормального роста и деления клеток, падению интенсивности синтеза протеина, что может привести к значительному снижению урожая пшеницы. В нашем исследовании содержание азота у сортов варьировало от 3,03 до 3,34%, а у родственных видов пшеницы — от 3,26 до 4,45%. По данному показателю особенно выделялись образцы дикой полбы (*T. dicoccoides*) (табл. 1). Уровень Ca и Mg у сортов в среднем составил 432,35 и 1381,66 мг/кг соответственно, что меньше, чем у видов рода *Triticum* (448,99 и 1677,78 мг/кг соответственно). Mg больше всего обнаружено в зерне *T. kiharae* (табл.1). Для образца культурной полбы (*T. dicoccum* к-45926) характерно высокое содержание обоих элементов. Высокая концентрация K и P была у образца *T. spelta* к-1731, хотя по накоплению других макроэлементов спельта значительно уступала остальным изученным видам (табл. 1). Значительный уровень калия также отмечен для *T. timopheevii* (7309,79 мг/кг), а фосфора — для *T. dicoccoides* к-5199 (7766,20 мг/кг). Среди исходных сортов можно отметить высокое накопление изученных макроэлементов у сорта Pitic S62 (табл. 1). Анализ сортов и сородичей пшеницы показал повышенный уровень содержания макроэлементов у образцов видов рода *Triticum*. В работах зарубежных ученых также отмечается превышение концентрации минералов в зерне родственных видов над культивируемыми сортами пшеницы. Например, установлено значительно более высокое накопление основных макро- и микроэлементов в зерне образцов дикой полбы по сравнению с сортами *T. aestivum* [10].

Несмотря на то, что микроэлементы необходимы растениям в относительно малых количествах, они обладают высокой биологической активностью и оказывают существенное влияние на обмен веществ. Многие из них входят в состав активных центров ферментов, позволяющих более интенсивно использовать

Таблица 1

Содержание макроэлементов в зерне родительских форм интрогрессивных линий

Генотип	N, %	P, мг/кг	Ca, мг/кг	Mg, мг/кг	K, мг/кг
Рассвет	3,07	5567,28 ± 391,94	308,14 ± 16,42	1329,37 ± 50,59	5865,08 ± 185,14
Саратовская 29	3,03	5064,82 ± 361,76	392,06 ± 26,56	1181,94 ± 24,99	5058,32 ± 354,16
Фестивальная	3,34	5575,52 ± 476,16	498,80 ± 61,71	1437,53 ± 17,02	5574,57 ± 302,20
Pitic S62	—	7169,35 ± 401,97	530,38 ± 2,22	1577,78 ± 10,00	6025,56 ± 14,62
<i>T.dicoccoides</i> к-5199	4,45	7766,20 ± 656,68	410,30 ± 37,65	1826,68 ± 65,64	6073,61 ± 510,87
<i>T.dicoccoides</i>	3,99	7495,72 ± 648,16	496,73 ± 13,79	1729,89 ± 43,82	6794,45 ± 182,69
<i>T.dicoccum</i> к-45926	3,87	6448,48 ± 251,59	578,19 ± 63,97	1796,47 ± 39,57	6888,08 ± 225,96
<i>T. timopheevii</i>	3,35	6857,38 ± 450,80	412,94 ± 22,10	1414,18 ± 128,13	7309,79 ± 846,21
<i>T.kiharae</i>	3,26	6665,54 ± 403,41	466,45 ± 25,80	2049,57 ± 30,27	6564,15 ± 87,07
<i>T. spelta</i> к-1731	3,39	7584,07 ± 524,65	329,38 ± 24,44	1249,86 ± 55,31	7781,88 ± 626,91

Примечание. «—» — параметр не определяли

энергию, воду, питательные вещества, и, соответственно, получать более высокий урожай. Проведенный анализ не показал существенных различий между сортами мягкой пшеницы и видами рода *Triticum* по содержанию Zn и Mn в зерне (рис. 1). Концентрация Zn у изученных сортов варьировала от 18,49 до 35,85 мг/кг, а у образцов сородичей пшеницы от 26,64 до 39,5 мг/кг, для Mn данный показатель находился в пределах 27,79–30,57 мг/кг и 19,56–37,62 мг/кг соответственно. По уровню накопления Fe и Cu (меди) отмечено значительное превышение видов рода *Triticum* (в среднем 73,99 и 10,41 мг/кг соответственно) над сортами (в среднем 53,81 и 4,24 мг/кг соответственно).

Самая высокая концентрация Fe выявлена у образца *T. dicoccum* к-45926 — 99,2 мг/кг, что согласуется с данными литературы. Например, в исследовании Balint et al. при сравнении содержания микроэлементов в зерне дикорастущих и культурных пшениц наибольший уровень железа также установлен для *T. dicoccum* [11]. Высокое содержание Cu характерно для образцов *T. dicoccoides* и *T. spelta* к-1731. В других работах также отмечена высокая концентрация меди в зерне спельты (в среднем 11,3 мг/кг), в то время как у сортов пшеницы этот показатель не превышал 7,4 мг/кг [11, 12].

Таким образом, средние значения содержания макро- и микроэлементов в зерне образцов видов рода *Triticum* были выше, чем у сортов

T. aestivum (превышение составило от 1,12 до 2,46 раза в зависимости от элемента), что указывает на возможность использования их для улучшения мягкой пшеницы по минеральному составу зерна. Среди родительских генотипов для дикой полбы выявлены максимальные значения по содержанию Zn и Cu, для культурной полбы — Fe и Ca, для спельты — K и P, для синтетической пшеницы *T. kiharae* — Mn и Mg. Высокий уровень комплекса элементов отмечен в зерне *T. dicoccum* (K, Ca, Fe, Mn, Cu) и *T. dicoccoides* к-5199 (N, P, Mg, Zn).

Дисперсионный анализ показал значимые различия средних значений накопления N, K, Mg, Ca, P, Mn в зерне четырех групп линий, созданных на основе *T. dicoccoides*, *T. dicoccum*, *T. kiharae*, *T. spelta* (табл. 2). Установлена также высокая статистическая значимость вклада родительского сорта мягкой пшеницы в изменчивость содержания в зерне всех изученных элементов, за исключением N и Fe (табл. 2).

Средние значения содержания всех изученных макро- и микроэлементов в зерне интрогрессивных линий превышали исходные сорта пшеницы, но уступали сородичам пшеницы, за исключением Mn и K, уровень которых у гибридов был выше, чем у обоих родительских форм. Для линий с генетическим материалом *T. dicoccoides* выявлено максимально высокое накопление Zn, Ca и Mg среди всех изученных интрогрессивных линий (рис. 2).

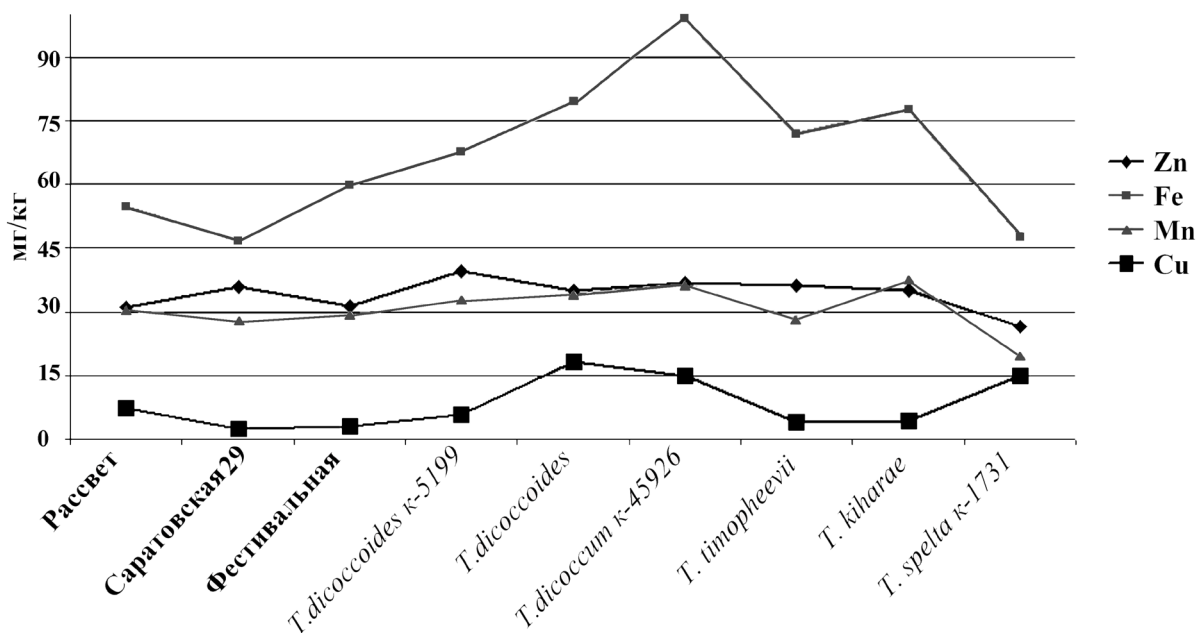


Рис. 1. Содержание микроэлементов в зерне родительских форм интрогрессивных линий, мг/кг

Таблица 2

Влияние генотипа родителей на среднее значение содержания основных минералов в зерне интрогрессивных линий мягкой пшеницы

Признак	Вид рода <i>Triticum</i>				Сорт <i>T. aestivum</i>			
	df	SS	MS	F	df	SS	MS	F
Zn	3	563,97	187,99	2,66	3	647,84	215,95**	3,12
Fe	3	941,07	313,69	2,26	3	416,12	138,71	0,94
Cu	3	131,69	43,90	2,05	3	363,50	121,17**	7,01
Mn	3	351,37	117,12*	2,70	3	734,86	244,95**	6,70
Ca	3	$1,23 \times 10^6$	$4,09 \times 10^5$ **	5,21	3	$7,24 \times 10^5$	$2,41 \times 10^4$ *	2,76
Mg	3	$8,97 \times 10^6$	$2,99 \times 10^6$ **	7,76	3	$1,24 \times 10^6$	$4,13 \times 10^5$ **	12,78
K	3	$3,55 \times 10^8$	$1,18 \times 10^8$ **	8,29	3	$3,22 \times 10^8$	$1,07 \times 10^7$ **	7,24
P	3	$8,39 \times 10^7$	$2,79 \times 10^7$ *	2,88	3	$1,37 \times 10^7$	$4,57 \times 10^6$ **	5,20
N	3	1,67	0,56**	6,41	3	0,36	0,12	0,71

Примечание. df — число степеней свободы; SS — суммы квадратов; MS — средние квадраты; F — критерий Фишера; * — достоверно при $p < 0,05$; ** — достоверно при $p < 0,01$

По уровню цинка особенно выделялись генотипы комбинации *T. dicoccoides* × Фестивальная, которые по данному показателю, как правило, превосходили обоих родителей, что может указывать на наличие у исходных форм разных генов, детерминирующих накопление цинка в зерне. По данным Peleg et al. с содержанием цинка в зерне гибридов от скрещивания твердой пшеницы сорта Langdon и образца дикой полбы G18-16 ассоциировано 6

QTL, причем 5 из них — аллели дикой полбы на хромосомах 2A, 5A, 6B, 7A, 7B и 1 — аллель сорта (2A) [13]. Концентрация магния у гибридных генотипов, созданных с участием дикой полбы, было выше, чем у родительских сортов. У линий 11-1, 13-3 и 16-5 *T. dicoccoides* × Фестивальная данный показатель был в пределах 1736,23–1793,64 мг/кг и превышал как сорт Фестивальная (1437,53 мг/кг), так и *T. dicoccoides* (1729,89 мг/кг).

Максимальный уровень Fe, Mn, Cu, K и P среди интрогрессивных линий характерен для группы на основе *T. dicoccum* (рис. 2). По комплексу признаков выделялась линия 1-3 *T. dicoccum* к-45926 × Фестивальная, которая превосходила исходный сорт по всем изученным макро- и микроэлементам за исключением Ca. Следует отметить особенно высокое накопление Cu, K и P (линия 1-3 превышала сорт на 122,67%, 58,79% и 39,56% соответственно). Высокие значения по содержанию данных элементов выявлены также для гибридов Pitic S62 × *T. dicoccum* к-45926. Например, концентрация меди в зерне линий данной комбинации составила 10,12 — 14,19 мг/кг, что приближается к показателю *T. dicoccum* к-45926 (14,96 мг/кг). По накоплению K и P линии 206-2 и 208-3 Pitic S62 × *T. dicoccum* к-45926 превосходили не только культурную полбу, но и все исследованные генотипы.

Содержание Fe, Mn, Ca и Mg у синтетической пшеницы *T. kiharae* был выше, чем у сортов, при этом в комбинации *T. kiharae* × Фестивальная накопление Fe и Mn было ближе к значениям сорта, а для *T. kiharae* × Саратовская 29 — к синтетической пшенице. Линия 19 *T. kiharae* × Саратовская 29 по содержанию Fe (79,3 мг/кг) превосходила не только лучшего родителя (77,8 мг/кг), но и все изученные генотипы с чужеродным генетическим материалом (50,86–75,3 мг/кг). Образец *T. kiharae* характеризовался максимальным накоплением магния в зерне среди исследованных генотипов — 2049,57 мг/кг. Линии *T. kiharae* × *T. aestivum* по данному показателю превышали родительские сорта, хотя не достигали уровня синтетической пшеницы. Следует выделить линию 28 *T. kiharae* × Фестивальная с самым высоким уровнем магния в зерне (1869,05 мг/кг) среди интрогрессивных линий.

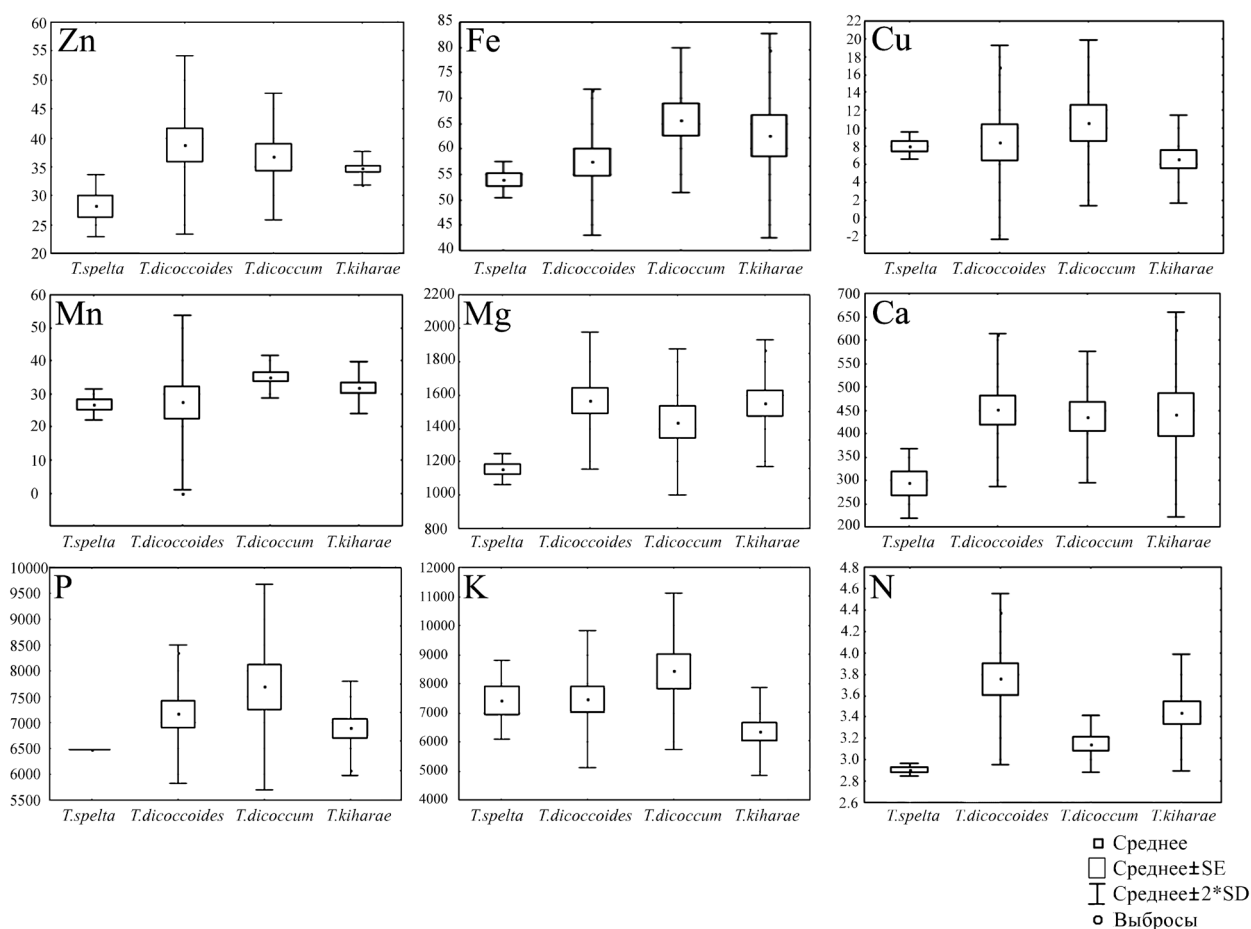


Рис. 2. Диаграммы разброса содержания микро- и макроэлементов в зерне групп линий с интрогрессией генетического материала *T. spelta*, *T. dicoccoides*, *T. dicoccum* и *T. kiharae*

Заключение

Изучение родительских форм показало, что средние значения содержания макро- и микроэлементов в зерне видов рода *Triticum* были выше, чем у сортов *T. aestivum* (в 1,12–2,46 раза в зависимости от элемента), что указывает на возможность использования их для улучшения мягкой пшеницы по минеральному составу зерна. Среди исходных генотипов для дикой полбы выявлены максимальные значения по накоплению Zn (39,51 мг/кг) и Cu (18,30 мг/кг), для культурной полбы — Fe (99,20 мг/кг) и Ca (578,19 мг/кг), для спельты — K (7781,88 мг/кг), для синтетической пшеницы *T. kiharae* — Mn (37,62 мг/кг) и Mg (2049,57 мг/кг). Высокий уровень комплекса элементов отмечен в зерне *T. dicoccum* (K, Ca, Fe, Mn, Cu) и *T. dicoccoides* к-5199 (N, P, Mg, Zn). Установлена высокая статистическая значимость вклада обоих родителей в изменчивость большинства изученных признаков интрогрессивных линий. Линии с чужеродным генетическим материалом, как правило, превосходили исходные сорта мягкой пшеницы, но уступали видам рода *Triticum* по содержанию основных минералов в зерне. Выделены линии, которые по уровню накопления отдельных элементов превышали обоих родителей: 11-1, 13-3 и 16-5 *T. dicoccoides* × Фестивальная по Zn и Mg; 206-2, 208-3 Pitic S62 × *T. dicoccum* к-45926, 1-3 *T. dicoccum* к-45926 × Фестивальная, 16-5 *T. dicoccoides* × Фестивальная — по K и P; 20-1 *T. kiharae* × Саратовская 29, 8 Саратовская 29 × *T. dicoccoides* — по Ca. Данные линии представляют интерес для селекции пшеницы на качество зерна.

Список использованных источников

1. Potential of *Aegilops* sp. for improvement of grain processing and nutritional quality in wheat (*Triticum aestivum*) / A. Kumar [et al.] // Front. Plant Sci. – 2019. – Vol. 10. – P. 308.
2. Welch, R. M. Breeding for micronutrients in staple food crops from a human nutrition perspective / R. M. Welch, R. D. Graham // J. Exp. Bot. – 2004. – Vol. 55, № 396. – P. 353–364.
3. Hafeez, B. Role of zinc in plant nutrition – a review / B. Hafeez, Y. M. Khanif, M. Saleem // American J. Exp. Agric. – 2013. – Vol. 3, № 2. – P. 374–391.
4. Potential for improving bioavailable zinc in wheat grain (*Triticum* species) through plant breeding / R. M. Welch [et al.] // J. Ag-

ric. Food Chem. – 2005. – Vol. 53, № 6. – P. 2176–2180.

5. Минеральный состав зерна диких сородичей и интрогрессивных форм в селекции пшеницы / Т. В. Савин и др. // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2018. – Т. 22, № 1. – С. 88–96.

6. Variation in mineral micronutrient concentrations in grain of wheat lines of diverse origin / F. J. Zhao [et al.] // Journal of Cereal Science. – 2009. – Vol. 49, № 2. – P. 290–295.

7. *Triticum dicoccoides*: an important genetic resource for increasing zinc and iron concentration in modern cultivated wheat / I. Cakmak [et al.] // Soil Sci. Plant Nutr. – 2004. – Vol. 50, № 7. – P. 1047–1054.

8. Сравнительная характеристика гибридных линий *Triticum aestivum*/*Triticum durum* и *Triticum aestivum*/*Triticum dicoccum* по геномному составу и устойчивости к грибным болезням в различных экологических условиях / Леонова И. Н и др. // Генетика. – 2013. – Т. 49, № 11. – С. 1276–1283.

9. Molecular cytogenetic analysis of alien introgressions in common wheat lines with *T. kiharae* genetic material / O. A. Orlovskaya [et al.] // Current challenges in plant genetics, genomics, bioinformatics, and biotechnology : proceedings of the fifth international scientific conference, Novosibirsk, June 24–29, 2019. / Institute of cytology and genetics, Siberian branch of the Russian Academy of Sciences ; eds.: A. Kochetov, E. Salina. – Novosibirsk, 2019. – P. 235–237.

10. Genetic diversity for grain nutrients in wild emmer wheat: potential for wheat improvement / M. Chatzav [et al.] // Annals of Botany. – 2010. – Vol. 105, № 7. – P. 1211–1220.

11. Comparison of the Cu, Zn, Fe, Ca and Mg contents of the grains of wild, ancient and cultivated wheat species / A. F. Balint [et al.] // Cereal Res. Commun. – 2001. – Vol. 29, № 3–4. – P. 375–382.

12. Murphy, K. M. Relationship between yield and mineral nutrient concentrations in historical and modern spring wheat cultivars / K. M. Murphy, P. G. Reeves, S. S. Jones // Euphytica. – 2008. – Vol. 163, № 3. – P. 381–390.

13. Quantitative trait loci conferring grain mineral nutrient concentrations in durum wheat x wild emmer wheat RIL population / Z. Peleg [et al.] // Theor. Appl. Genet. – 2009. – Vol. 119, № 2. – P. 353–369.

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

GRAIN MINERAL COMPOSITION OF BREAD WHEAT LINES WITH INTROGRESSIONS OF THE TRITICUM SPECIES GENETIC MATERIAL

State Scientific Institution

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

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

O.Orlovskaya@igc.by

Grain mineral composition of bread wheat lines with introgressions of the genetic material of *Triticum* genus species in comparison with parental forms was investigated. The average content of macro- and microelements in the grain of *Triticum* genus species was higher than in the varieties of *T. aestivum* (1.12–2.46 times higher depending on the element). As a rule, the lines with foreign genetic material exceeded the original varieties of bread wheat, but were inferior to the *Triticum* genus species by the content of main minerals in grain. Lines 11-1, 13-3 and 16-5 of *T. dicoccoides* × Festivalnaya were identified as exceeding both parents in terms of Zn and Mg accumulation; lines 206-2, 208-3 Pitic S62 × *T. dicoccum* k-45926, 1-3 *T. dicoccum* k-45926 × Festivalnaya, 16-5 *T. dicoccoides* × Festivalnaya — in terms of K and P content; 20-1 *T. kiharae* × Saratovskaya 29, 8 Saratovskaya 29 × *T. dicoccoides* — in terms of Ca accumulation.

Keywords: species of the genus *Triticum*, introgression lines of bread wheat, micro- and microelements' content in grain.

Дата поступления статьи: 25 августа 2020 г.

Е. В. Гузенко, М. В. Богданова, В. И. Сакович, В. А. Лемеш

ПОИСК МИКРОСАТЕЛЛИТНЫХ ЛОКУСОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ С ДЛИТЕЛЬНОСТЬЮ ФАЗ РАЗВИТИЯ ПРИ ПОНИЖЕННОЙ ВЛАГООБЕСПЕЧЕННОСТИ, У ЛЬНА МАСЛИЧНОГО (*LINUM USITATISSIMUM* L.)

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

Представлены результаты применения методов поиска ассоциаций в анализе коллекции льна масличного различного географического происхождения (23 страны). С помощью микросателлитных маркеров установлена значительная генетическая гетерогенность коллекции. Значение коэффициента полиморфизма (PIC) в среднем составило 0,362 на локус, частота встречаемости большинства аллелей — менее 50%. Суммарно из 168 аллелей, выявленных в 12 SSR-локусах, 36 были уникальными. В зависимости от локуса, число уникальных аллелей варьировало от одного (локусы Lu10, Lu13) до семи (Lu25, Lu4). Для анализа ассоциаций использовано программное обеспечение TASSEL 2.1. Идентифицировано два SSR-локуса, которые ассоциированы с продолжительностью фаз развития льна масличного на значительном уровне достоверности: Lu13 с фазами «всходы – елочка» ($P \leq 0,01$) и «ранняя желтая спелость – желтая спелость» ($P \leq 0,001$), Lu66 с фазой «бутонизация – цветение» ($P \leq 0,001$). Засуха в указанные фазы вегетативного развития является лимитирующим фактором получения гарантированного урожая льна масличного. Установленные положительные и отрицательные значения коэффициента регрессии указывают на возможность отбора растений как с продолжительным периодом указанных фаз развития, так и с коротким периодом, что должно учитываться при выведении устойчивых к засухе сортов льна масличного для различных агроклиматических условий.

Ключевые слова: лен масличный, фазы развития, устойчивость к засухе, генетическая гетерогенность, SSR-маркеры.

Введение

Абиотические стрессы являются лимитирующими факторами роста сельскохозяйственно-го производства и основной причиной потери урожая во всем мире. В ответ на неблагоприятные экологические факторы (засуха, затопление, экстремальная температура, засоление и др.) в растениях происходят структурные и метаболические перестройки, которые препятствуют стрессу. Различные стрессовые сигналы изменяют генную экспрессию в направлении индуцирования или угнетения синтеза специфических метаболитов, прежде всего, структурных белков или ферментов специфических метаболических путей. При морфологическом анализе растений можно обнаружить лишь те изменения, которые имеют фенотипическое проявление. Анализ генетических ресурсов

растений с использованием молекулярных маркеров позволяет выявлять скрытую изменчивость и тем самым целенаправленно подходить к более точной дифференциации и идентификации образцов, в том числе и к выявлению ценных генотипов [1].

Идентификация генов и аллелей, контролирующих разнообразие сложных признаков, является важной теоретической и прикладной задачей генетики. Информация об этих генах позволяет получить новые знания о биологических системах, участвующих в формировании таких признаков. Кроме того, знание конкретных аллельных вариантов, контролирующих сложные признаки, позволяет вести направленную эффективную селекцию.

Существует несколько подходов к идентификации генов и аллелей [2]. Одним из

методов установления ассоциации между ДНК-маркерами и сельскохозяйственными признаками является GWAS (genome-wide association study, или полногеномный анализ ассоциаций — ПГАА, или ассоциативное картирование) [3]. В данном методе используется принцип неравновесного сцепления (*linkage disequilibrium*) (или ассоциации). Метод анализа ассоциаций обнаруживает локусы количественных признаков, которые отвечают за гораздо меньший процент вариативности, чем позволяет анализ обычного сцепления, и предполагает сравнение аллелей гена-кандидата у индивидов, обладающих интересующим исследователей признаком, и индивидов, не обладающих данным признаком. В отличие от метода двуродительского картирования, в ассоциативном картировании используется генетически разнообразная обширная коллекция, что дает возможность увеличения мощности разрешения картирования локусов количественных признаков и идентификации большего количества значимых аллелей [4].

Первые исследования по ассоциативному картированию у растений были проведены на овсе [5] и рисе [6]. Позже ассоциативное картирование было применено на таких культурах, как свекла, ячмень, кукуруза, пшеница, картофель и арабидопсис. В работе M. Hansen et al. сообщалось об ассоциации AFLP-маркеров с генами раннего цветения у свеклы [7]. У ячменя урожайность, время цветения, высота растений, устойчивость к бурой ржавчине и некоторые другие признаки были ассоциированы с разными типами молекулярных маркеров [8–11]. У кукурузы SSR- и SNP-маркеры использовали для выявления ассоциаций между временем цветения и высотой растения [12, 13]. F. You et al. генотипировали канадскую коллекцию льна масличного с помощью панелей, включающих 1,7 миллионов однонуклеотидных полиморфизмов и выявили связь пятидесяти SNPs с урожайностью [14].

Методы ассоциативного картирования применяются также для поиска генетических детерминант урожайности — ключевой характеристики любой сельскохозяйственной культуры. Формирование отдельных элементов структуры урожая протекает в разные ста-

дии развития растения. Периоды онтогенеза существенно различаются как по отношению растений к факторам внешней среды, так и по степени влияния этих факторов на качество урожая. Анализ многолетних наблюдений за фенологическими фазами развития льна масличного показал, что время наступления фаз развития льна масличного и их продолжительность в значительной степени связаны с сортовыми особенностями и влиянием погодных условий [15]. Сухая жаркая погода в период цветения способствует более дружному прохождению фазы «бутонизация — цветение». Однако для льна нежелательно как очень дружное, так и затяжное цветение. При коротком периоде цветения образуются укороченные соцветия с меньшим числом коробочек, что отрицательно влияет на урожай семян, продолжительное цветение затягивает созревание и создает трудности для уборки, увеличивая потери урожая [16].

Помимо внешних факторов, лимитирующих урожайность, большое значение имеют генетические особенности, обуславливающие приспособительные характеристики растений, в т. ч. эффективность прохождения различных фаз развития под действием среды. Для успешного прохождения растением той или иной стадии развития необходим определенный комплекс внешних условий, в том числе влагообеспеченность. Лен масличный является культурой достаточно требовательной к влаге. Особенно отрицательно ее недостаток отражается на периоде от посева до ранней желтой спелости. Наибольшая потребность во влаге отмечается в период быстрого роста, бутонизации и цветения. Обеспеченность влагой является одним из важнейших условий формирования высокого урожая хорошего качества. Однако избыточное увлажнение посевов после цветения во время созревания приводит к полеганию льна и способствует развитию различных грибных болезней [17].

Таким образом, особенности генотипа в сочетании с благоприятными условиями окружающей среды позволяют растению быстро и эффективно проходить стадии развития, что приводит к накоплению вегетативной массы растения и увеличению семенной продуктивности.

Целью данной работы являлся поиск ассоциаций между полиморфизмом микросател-

литных локусов и длительностью фаз вегетативного развития льна масличного в условиях пониженной влагообеспеченности.

Материалы и методы

Материалом для исследований служила коллекция льна масличного, которая состояла из 88 образцов различного географического происхождения (табл. 1).

Все образцы были высеяны в естественных условиях на экспериментальном участке Центрального ботанического сада НАН Беларуси (г. Минск) в оптимальные сроки

с соблюдением норм посева: 1 м² — 8 рядков, 60 штук семян на погонный метр. Проведены наблюдения за продолжительностью межфазных периодов развития растений: «посев — всходы», «всходы — елочка», «елочка — бутонизация», «бутонизация — цветение», «цветение — зеленая спелость», «зеленая спелость — ранняя желтая спелость», «ранняя желтая спелость — желтая спелость», «вегетационный период».

Для молекулярно-генетического анализа ДНК выделяли из листьев (50–100 мг). Растительный материал измельчали с помощью TissueLyser

Таблица 1

Перечень образцов льна масличного, использованных в исследовании

№	Страна происхождения	Образцы льна масличного
1	Австралия	Glenelg
2	Аргентина	Фландес
3	Беларусь	K-5990, K-5991, K-604, K-603, K-5992, ЛМ-2, Сонечны
4	Великобритания	Crown, Blue Chip
5	Венгрия	Endress Olajlen
6	Германия	Лирина
7	Индия	Nameless K 1341, NF-115, Nameless K-180
8	Италия	Nameless K-1210
9	Иран	Nameless K-999
10	Канада	Sel. of Clli-1856, Gold Flax, ASM Duff, McGregor, Somme, Л-6582, K-6570, Lightning, AC Carnduff, CDC Normabdy, AC Linora, Norlin, Cree, Stormont Gossamert
11	Китай	K-2398
12	Марокко	Maroccan, 4-oZ 7 (ex 196-12), Marocian
13	Нидерланды	SU-6-15, Deep Pink
14	Польша	Шафир, R/135 (INF-877), Gold Merchant, Eole (INF-878), Oliver, Циан
15	Россия	Ручеек, Небесный, Славный 82, LM-98, 3871, Спартак, Воронежский, K-5627, K-5621, Воронежский (2), № 3896
16	Румыния	Raluca, Deta
17	США	Maritime, Bison, Koto, Linota, Wirona Sel, Rio, Redwing Sel, Minn, Linota (2), Omega, SU-1-10, Leona, Culbert, M-25-330
18	Таджикистан	Памир (бел)
19	Узбекистан	Nameless K-71, Nameless K-72, Бахмальский-1056
20	Уругвай	K-5827
21	Франция	Michail, Antares, Atalante. Mivast, Alaska ERA, Ocean
22	Чехия	Lola (INF-843), Амон, Al-340, Sandra
23	Эфиопия	Abyssinian

Таблица 2

Условные обозначения фаз вегетативного развития льна масличного

Фаза развития	Название фазы	Условное обозначение
I	посев – всходы	SS
II	всходы – елочка	SFIR
III	елочка – бутонизация	FIRB
IV	бутонизация – цветение	BFL
V	цветение – зеленая спелость	FGR
VI	зеленая спелость – ранняя желтая спелость	GREY
VII	ранняя желтая спелость – желтая спелость	EYY
	вегетационный период	VEG

II (Qiagen, Германия), помещали в 1,5 мл микроцентрифужные пробирки и ресуспендировали в 200 мкл ТЕ буфера (10 mM Tris-HCl, pH 7,5; 1 mM EDTA). Далее использовали Genomic DNA Purification Kit (#K0512) (Thermo Fisher Scientific, США) в соответствии с инструкцией производителя. Концентрацию ДНК измеряли с помощью спектрофотометра NanoPhotometer N (Implen, Германия).

Анализ полиморфизма микросателлитных повторов ДНК проводили с использованием флуоресцентно-меченых праймеров (табл. 3) [16, 17]. Реакционная смесь включала 20 нг геномной ДНК, по 0,25 мкМ прямого и обратного праймера, 200 мкМ каждого dATP, dCTP, dGTP и dTTP, от 1,5 до 2,5 mM MgCl₂ и 1 единицу Taq-полимеразы в инкубационном буфере.

ПЦР проводили в термоциклере MyCycler™ (BioRad, США) в следующих условиях: 94 °C в течение 5 мин, 25 циклов с параметрами: денатурация при температуре 94 °C в течение 30 с, отжиг праймеров в течение 45 с (температура отжига подбиралась в зависимости от праймера), элонгация при 72 °C в течение 40 с. Конечная элонгация при 72 °C 5 мин.

Продукты амплификации денатурировали формамидом и разделяли методом капиллярного электрофореза на генетическом анализаторе ABI Prism 3500 (Applied Biosystems, США). Определение размеров аллелей осуществляли при помощи программного обеспечения GeneMapper v4.1. (Applied Biosystem, США), используя внутренний стандарт высокой плотности для фрагментного анализа GeneScan™ 600 LIZ® (Thermo Fisher Scientific, США).

Информация об аллельном составе SSR-локусов исследуемых форм заносилась в электронную базу данных в формате Microsoft Excel-2003. Для расчета индекса информативности маркеров использовали надстройку для электронной таблицы MS Excel — GenAlEx 6.41 [20].

Филогенетические отношения между исследуемыми формами были изучены путем расчета парных генетических расстояний Nei [21] с использованием GenAlEx 6.41 [20]. Кластерный анализ проведен с помощью программы DARwin5 (версия 6.0.018) [22] и STRUCTURE 2.3.4 [23]. Данная программа использует методы Монте Карло по схеме марковской цепи (Markov Chain Monte Carlo, MCMC), что позволяет минимизировать неравновесие Харди-Вайнберга и неравенство по сцеплению локусов в кластерном анализе индивидов. Количество кластеров (K) находилось в диапазоне от 1 до 10. Для визуализации результатов, их математического подтверждения методами Evanno [24] была использована веб-программа STRUCTURE Harvester [25]. Данная web-программа применена для детекции подходящего количества кластеров путем их индивидуального перебора.

Для анализа ассоциаций использовали программное обеспечение TASSEL 2.1 на основе модели MLM, включающее опции с матрицами Q и K [26].

Для корректной работы программы TASSEL 2.1 ввели условные обозначения для фаз вегетативного развития (табл. 2).

Таблица 3

Характеристика панели микросателлитных маркеров, использованных в анализе [18, 19]

№	Название олигонуклеотида	Последовательность олигонуклеотида, 5' → 3'	Метка 5'
1	LU 1_F	TCATTCATCTCCTTCCACTAAAA	FAM
2	LU1_R	TTGAAAGCCCTAGTAGACACCA	
3	LU 7_F	CATCCAACAAAGGGTGGTG	R6G
4	LU 7_R	GGAACAAAGGGTAGCCATGA	
5	LU 25_F	TCTACAGAGTTCAATCCCCGTAA	R6G
6	LU 25_R	GTTGGACCTTACAAGACTCACTG	
7	LU8_F	TCCCGTAATATTCTATGTTCTTCC	TAMRA
8	LU8_R	TGAGTTGGACCTTACAAGACTCA	
9	LU10_F	GCCTAAAGCTGATGCGTTTC	R6G
10	LU10_R	TGTCAGGCTCCTTCTTTTGC	
11	LU11_F	ATGGCAGGTTCTGCTGTTTC	R6G
12	LU11_R	TTGCGTGATTATCTGCTTCG	
13	LM-66_F	TTATTATTAATTCAACCACAACGC	FAM
14	LM-66_R	CGATGAAGCTTGTGATGCTG	
15	LU 3_F	GCTCGTGATCTCCTTCATCC	FAM
16	LU 3_R	AAAACCACGTCCAGATGCTC	
17	LU 4_F	TTATTTCCGGACCCTTTCAA	FAM
18	LU 4_R	AAACTACCGCCGGTGATGAT	
19	LU13_F	AAGATGACGTCGGTGGTGAT	TAMRA
20	LU13_R	CGGAACCTTCCATTTTCCTC	
21	LU15_F	TGGACGACGATGAAGATGAA	TAMRA
22	LU15_R	CCGCCGGGTACACTACTACT	
23	LU38_F	GATCTTGTTGCCTGGGAAAG	TAMRA
24	LU38_R	TTCGTTTGCAATACGTCAGC	

Результаты и обсуждение

В настоящее время лен масличный входит в число десяти основных масличных культур с широким ареалом возделывания. Традиционно в Беларуси возделывается лен-долгунец, а малочисленность посевов льна масличного, несмотря на возрастающую потребность различных отраслей промышленности в льняном масле, объясняется ограниченным числом районированных отечественных сортов. С целью создания новых высокоурожайных сортов льна масличного, адаптированных к условиям изменяющегося климата, необходимо изучать генетическое разнообразие мирового генофонда.

В нашем исследовании мы анализировали коллекцию из 88 форм льна масличного (табл. 1) из различных регионов мира с характерными особенностями климата. Большинство образцов коллекции представлено формами из стран европейской части (45), вторая по численности группа образцов из Северной Америки (28), 9 форм стран Азии, малочисленная группа образцов из Африки (4), Южной Америки (1), Австралии (1). В анализе использовано 12 полиморфных микросателлитных маркеров (SSR-маркеры) (табл. 4).

Аллельный состав микросателлитных локусов для каждого образца льна масличного, включенного в исследование, определяли по

набору индивидуальных фрагментов ДНК, амплифицированных парой праймеров, специфичных к последовательностям, фланкирующим определенный микросателлитный повтор ДНК. Размер и количество аллелей, обнаруженных для каждого локуса, а также расчетные показатели, отражающие генетическое разнообразие сортов, приведены в таблице 4. В целом выявлено 168 аллелей размером от 94 до 265 п. н. Число аллелей на локус в изученной выборке варьировало от 2 (локус Lu38) до 33 (локус Lu25), при этом среднее значение составило 14,0. Значения коэффициента полиморфизма (PIC) варьировали от 0,102 (локус Lu3) до 0,608 (локус Lu11), в среднем 0,362 на локус. Частота встречаемости различных аллелей 12-ти микросателлитных локусов в изученной выборке варьировала от 16,7% до 100%. При этом подавляющее большинство аллелей встречалось с частотой менее 50%.

Оценивая полиморфизм SSR-локусов, мы отдельно учитывали частоту встречаемости уникальных аллелей, которые характеризуют оригинальность генофонда. Суммарно из 168 аллелей, выявленных в 12 SSR-локусах, 36 были уникальными. В зависимости от локуса число уни-

кальных аллелей варьировало от одного (локусы Lu10, Lu13) до семи (Lu25, Lu4). Максимальное число уникальных аллелей было зафиксировано у сорта Sel.of Clli-1856 (Канада) — 4 аллеля, по 3 уникальных аллеля найдено у образцов K-5827 (Уругвай) и Воронежский (Россия), по 2 уникальных аллеля выявлено у образцов Лирина (Германия), Al-340 (Чехия), Amon (Чехия) и K-2398 (Китай) (табл. 5).

По результатам исследования полиморфизма SSR-локусов выполнен кластерный анализ с помощью программы STRUCTURE 2.3.4 [24]. В данной программе для микросателлитных данных основное допущение состоит в том, что предполагаемые популяции находятся в относительном равновесии Харди-Вайнберга в равновесии по сцеплению. Оценку дисперсии выборки для анализа структуры популяции проводили на основе пяти независимых прогонов для каждого k-элемента выборки. В программе STRUCTURE реализован байесовский алгоритм кластеризации генотипов в K кластерах с учетом априорной информации о географическом положении рассматриваемых популяций. Для выбора оптимального K, где $1 \leq K \leq 10$, использовался логарифм правдо-

Таблица 4

Показатели полиморфизма SSR-локусов льна масличного

Локус	Количество аллелей	Размер аллелей (п. н.)	PIC	Количество уникальных аллелей
Lu 1	10	129–155	0,454	3
Lu 7	21	133–199	0,405	4
Lu 25	33	119–265	0,486	7
Lu8	15	147–178	0,536	5
Lu10	12	135–173	0,501	1
Lu11	9	134–173	0,608	4
Lu66	6	141–152	0,102	0
Lu 3	25	142–203	0,256	2
Lu 4	22	94–165	0,458	7
Lu13	5	105–113	0,092	1
Lu15	8	108–126	0,223	2
Lu38	2	96–108	0,227	0
Итого	168	—	—	36
Среднее на локус	14	—	0,362	3

Таблица 5

Уникальные аллели, характерные для изученных образцов льна масличного

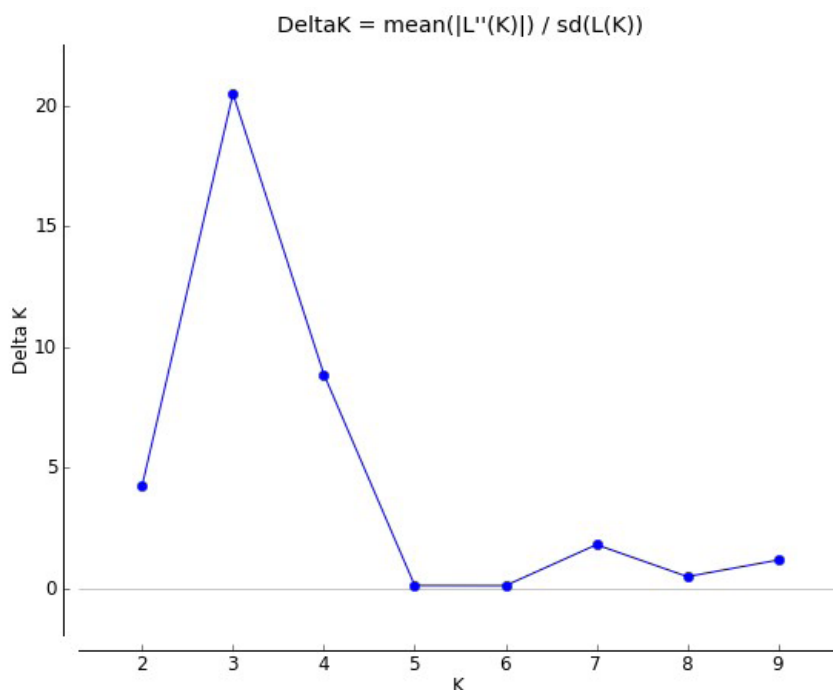
Аллель		Образец	Аллель		Образец
Lu1	129	Sel.of Clli-1856 (Canada)	Lu3	173	Koto (USA)
	143	Atalante (France)		194	Lola (INF-843) (Czech Republic)
	155	Maritime (USA)	Lu4	104	Voronezhskii (Russia)
Lu10	170	Marocian (Morocco)		110	Al-340 (Czech Republic)
Lu11	136	Eole (INF-878) (Poland)		112	Al-340 (Czech Republic)
	159	Sel.of Clli-1856 (Canada)		124	Maroccan (Morocco)
	170	Lirina (Germany)		156	K-604 (Belarus)
	173	Lirina (Germany)		158	SU-1-10 (USA)
Lu13	109	Amon (Czech Republic)		165	K-5827 (Uruguay)
Lu15	118	Glenelg (Australia)	Lu7	133	Sel.of Clli-1856 (Canada)
	124	Ocean (France)		136	Sel.of Clli-1856 (Canada)
Lu25	127	K-5827 (Uruguay)		190	Culbert (USA)
	157	4-oZ 7 (ex 196-12) (Morocco)		197	Endress Olajlen (Hungary)
	168	Voronezhskii (Russia)	Lu8	152	Slavnyi 82 (Russia)
	172	K-2398 (China)		160	Amon (Czech Republic)
	197	Wirona Sel (USA)		171	K-5827 (Uruguay)
	224	Redwing Sel (USA)		174	Michail (France)
	227	Voronezhskii (Russia)		176	K-2398 (China)

подобия LnPD с помощью on-line приложения к программе STRUCTURE Harvester [25], в котором для определения истинного количества генетических групп используется метод Эванно [24]. Пик на графике (рис. 1а) отражает наиболее вероятное число исходных кластеров равное трем при проведенном нами анализе.

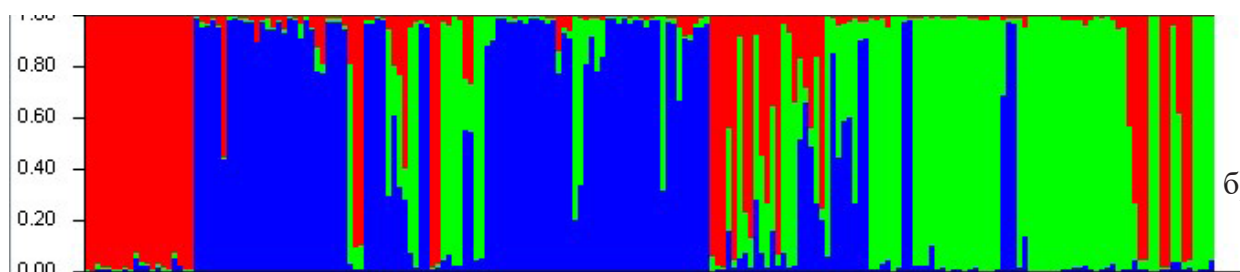
Дендрограмма генетического подобия между изученными образцами была построена невзвешенным парно-групповым методом кластерного анализа с арифметическим усреднением (рис. 2). Анализ дендрограммы не выявил четкого группирования форм по географическому происхождению, обнаружено довольно равномерное распределение форм по ветвям дендрограммы генетического подобия. Следует отметить, что образцы из Беларуси, России, Польши, Чехии и США наиболее представлены в одной из ветвей, что может свидетельствовать об использовании сходного генетического материала в селекционных программах данных стран.

Одним из важнейших факторов успешного поиска ассоциаций является высокая генетическая гетерогенность выборки. Если при анализе не учитывать влияние структуры изучаемой популяции, то тестовая статистика может быть завышена, и, как следствие, будет затруднена статистическая интерпретация данных. Это, в свою очередь, может привести к ложноположительным результатам (ложное утверждение о наличии «статистически значимой ассоциации» и, как следствие, «идентификации локуса»). В результате проведенного генотипирования установлена значительная генетическая гетерогенность 88 форм льна масличного, и данная популяция использована нами для поиска ассоциаций.

С целью измерения фенотипических характеристик, необходимых для поиска локусов, контролирующих количественные признаки, все формы были высеяны в естественных условиях для фиксации продолжительности фаз развития. Лен является влаголюбивой



а)



б)

Рис. 1. Результаты обсчета данных анализа полиморфизма микросателлитных локусов 88 форм льна масличного в STRUCTURE 2.3.4

а) значения функции ΔK (ось ординат) от возможного числа кластеров (ось абсцисс). Значение по оси ординат, соответствующее пику, указывает на истинное количество кластеров (в данном случае 3). Высота пика отражает выраженность популяционной структуры

б) разные оттенки серого соответствуют трем кластерам и отображают вероятность принадлежности к ним исследованных форм, по вертикали – доля частот аллелей соответствующего кластера (апостериорная вероятность)

культурой. На образование единицы сухого вещества он расходует 400–430 единиц воды в течение вегетационного периода [17]. Особенно высока потребность в воде в период быстрого роста, бутонизации, цветения. Хорошая влагообеспеченность в это время способствует получению высокого урожая семян. При недостатке влаги уменьшается ветвление, задерживается образование бутонов, сокращается продолжительность периода цветения, формируется небольшое количество коробочек с мелкими семенами пониженной масличности.

По данным полевых наблюдений в 2018 и 2019 гг. критические для получения гаранти-

рованного урожая фазы развития льна масличного приходились на май – июнь. Средняя температура воздуха в эти месяцы составляла $+17,3^{\circ}\text{C}$ с отклонением от среднего многолетнего значения на $+2,45^{\circ}\text{C}$; количество осадков — 55,5 мм (на 25% ниже нормы). В условиях 2018 года длительность периода «всходы – елочка» – «бутонизация – цветение» в среднем составила $44,22 \pm 0,55$ дня, при этом наиболее продолжительный период — 50 дней — зафиксирован у сортов R/135 (Польша), Gold Merchant (Польша) и наименьший — 40 дней — у сорта CDC Normabdy (Канада). В условиях 2019 года продолжительность

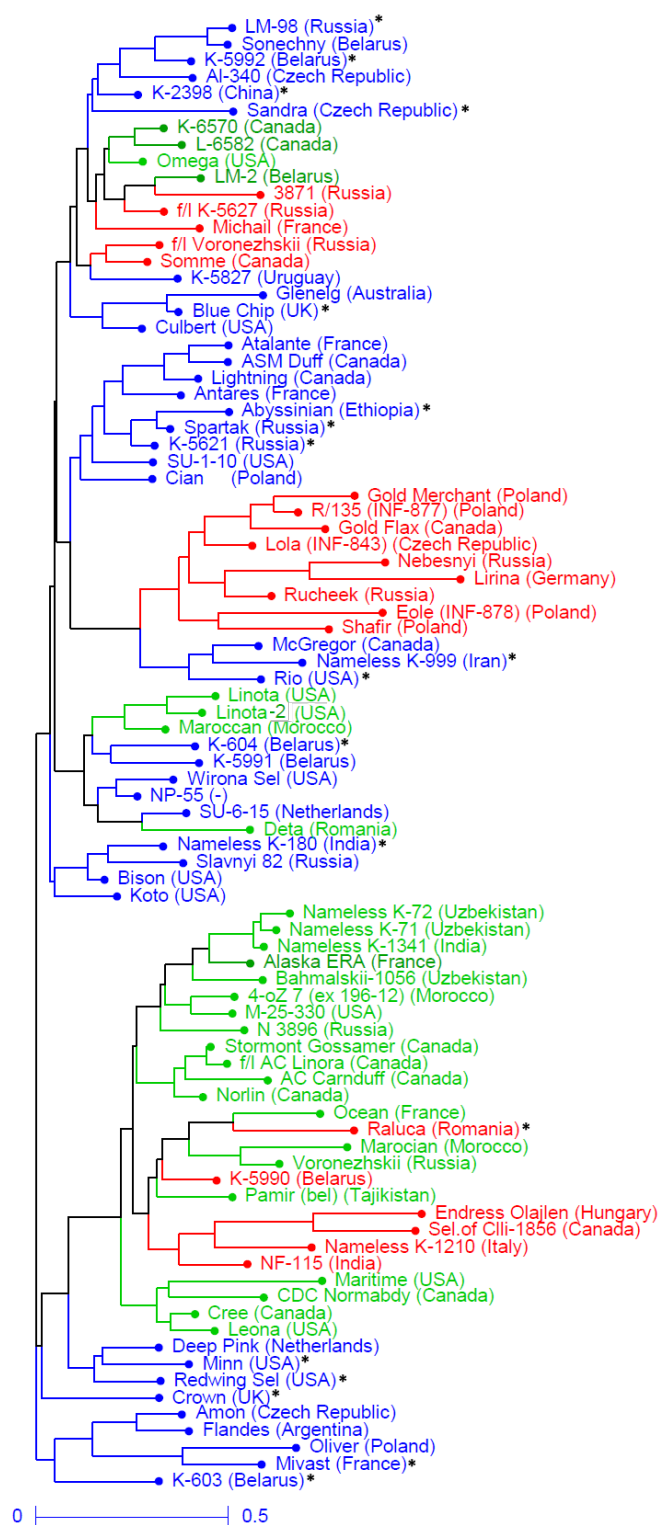


Рис. 2. Дендрограмма филогенетических взаимоотношений между сортами льна масличного, построенная на основании анализа полиморфизма микросателлитных локусов

периода «всходы – елочка» – «бутонизация – цветение» у исследуемых образцов в среднем составила $36,8 \pm 0,24$ дней, при этом наиболее длительный период — 42 дня — зафиксирован у сортов R/135 (Польша), Gold Merchant (Польша), Gold Flax (Канада), Лирина (Германия) и наименьший — 32 дня — у сорта K-604 (Беларусь).

В целом, погодные условия в мае – июне 2018 и 2019 гг. характеризовались как засушливые, отмечалась задержка в вегетативном развитии и пониженная продуктивность всех исследованных форм.

Анализ ассоциации между продолжительностью фаз развития и SSR-маркерами проводили с использованием программного обеспечения TASSEL 2.1 в смешанной линейной модели дисперсионного анализа (MLM).

Анализ ассоциаций показал, что каждая из восьми фаз вегетативного развития с разной степенью достоверности связана с одной и той же группой микросателлитных локусов Lu1, Lu8, Lu11, Lu13, Lu15, Lu38, Lu66 (7 из 12, взятых в исследование) (табл. 6).

По данным 2018 года было установлено, что с продолжительностью фазы развития «посев – всходы» (SS) статистически достоверно связаны SSR-локусы Lu15 ($P \leq 0,05$) и Lu8 ($P \leq 0,001$), с фазой «всходы – елочка» (SFIR) — локус Lu13 ($P \leq 0,05$), с фазой «бутонизация – цветение» (BFL) — локус Lu66 ($P \leq 0,01$), с фазой «цветение – зеленая спелость» (FGR) — локус Lu13 ($P \leq 0,05$), с фазой «ранняя желтая спелость – желтая спелость» (EYY) — локусы Lu66 ($P \leq 0,05$) и Lu13 ($P \leq 0,001$) (табл. 6).

По данным 2019 года с фазой развития «всходы – елочка» (SFIR) статистически достоверно оказались связаны SSR-локусы Lu15 ($P \leq 0,001$) и Lu13 ($P \leq 0,01$), с фазой «елочка – бутонизация» (FIRB) — локусы Lu13 ($P \leq 0,01$) и Lu66 ($P \leq 0,001$), с фазой «бутонизация – цветение» (BFL) — локус Lu66 ($P \leq 0,001$), с фазой «цветение – зеленая спелость» (FGR) — локус Lu15 ($P \leq 0,05$), с фазой «зеленая спелость – ранняя желтая спелость» (GREY) — локус Lu15 ($P \leq 0,001$), с фазой «ранняя желтая спелость – желтая спелость» (EYY) — локусы Lu13 ($P \leq 0,001$) и Lu15 ($P \leq 0,001$). Также локусы Lu66 ($P \leq 0,01$) и Lu13 ($P \leq 0,01$) показали связь с длиной вегетационного периода (VEG) (табл. 6).

Таблица 6

Микросателлитные локусы, ассоциированные с фазами развития масличного льна

Фаза развития	Локус	2018 год		2019 год	
		P	r ² , %	P	r ² , %
I (SS) посев – всходы	Lu38	0,6625	0,18%	0,5395	0,21%
	Lu66	0,1073	2,41%	0,0051	3,11%
	Lu1	0,1057	5,87%	0,047	4,98%
	Lu15	0,0017*	5,71%	0,0712	2,75%
	Lu13	0,2103	1,78%	0,1381	1,45%
	Lu11	0,1585	2,73%	0,4349	1,39%
	Lu8	1,86x10^{-5***}	10,36%	0,0102	5,54%
II (SFIR) всходы – елочка	Lu38	0,7697	0,14%	0,2277	0,47%
	Lu66	0,8243	0,93%	0,053	2,04%
	Lu1	0,1944	6,62%	0,2192	3,69%
	Lu15	0,0073	6,23%	5,78x10^{-9***}	7,47%
	Lu13	0,0038*	4,62%	2,17x10^{-4**}	3,45%
	Lu11	0,9982	0,47%	0,4148	1,42%
	Lu8	0,0052	10,10%	0,0494	4,65%
III (FIRB) елочка – бутонизация	Lu38	0,7626	0,15%	0,8851	0,06%
	Lu66	0,0092	4,85%	1,21x10^{-8***}	9,79%
	Lu1	0,4259	5,80%	0,5086	4,38%
	Lu15	0,0155	6,06%	0,0506	4,05%
	Lu13	0,6221	1,30%	2,88x10^{-4**}	4,88%
	Lu11	0,9953	0,62%	0,2649	2,41%
	Lu8	0,4134	6,65%	0,2038	5,56%
IV (BFL) бутонизация – цветение	Lu38	0,1175	0,80%	0,0083	2,25%
	Lu66	3,53x10^{-4**}	4,51%	1,35x10^{-7***}	9,40%
	Lu1	0,0086	6,42%	0,1624	6,08%
	Lu15	0,1156	2,80%	0,1854	3,39%
	Lu13	0,0261	2,31%	0,0131	3,51%
	Lu11	0,7268	1,10%	0,9351	0,97%
	Lu8	0,0167	5,91%	0,6567	4,80%
V (FGR) цветение – зеленая спелость	Lu38	0,7294	0,16%	0,9473	0,03%
	Lu66	0,0588	3,35%	0,7556	1,10%
	Lu1	0,2807	6,14%	0,0217	8,98%
	Lu15	0,5342	2,55%	0,0018*	7,32%
	Lu13	0,0038*	4,49%	0,03	3,64%
	Lu11	0,9292	1,09%	0,5642	2,26%
	Lu8	0,6941	4,81%	0,9361	3,97%

Продолжение таблицы 6

Фаза развития	Локус	2018 год		2019 год	
		P	r ² , %	P	r ² , %
VI зеленая спелость – ранняя желтая спелость	Lu38	0,4014	0,33%	0,9548	0,02%
	Lu66	0,1335	1,92%	0,2138	1,95%
	Lu1	0,3446	3,92%	0,0489	6,64%
	Lu15	0,0126	3,99%	4,98x10^{-6***}	8,52%
	Lu13	0,9748	0,27%	0,9009	0,56%
	Lu11	0,2358	2,08%	0,0661	3,57%
	Lu8	0,0264	6,17%	0,4039	5,62%
VII (ЕУУ) ранняя желтая спелость – желтая спелость	Lu38	0,7258	0,15%	0,777	0,10%
	Lu66	0,0024*	4,65%	0,0527	2,47%
	Lu1	0,0858	6,39%	0,1505	4,85%
	Lu15	0,8449	1,46%	3,34x10^{-6***}	7,23%
	Lu13	1,10x10^{-5***}	6,23%	2,83x10^{-5***}	4,95%
	Lu11	0,7834	1,34%	0,1126	2,58%
	Lu8	0,5562	4,52%	0,0317	6,12%
(VEG) вегетационный период	Lu38	0,9907	0,00%	0,4654	0,38%
	Lu66	0,0023	4,95%	4,82x10^{-4**}	6,04%
	Lu1	0,7525	3,79%	0,2945	5,77%
	Lu15	0,1687	3,52%	0,0385	4,91%
	Lu13	0,0692	2,68%	3,51x10^{-4**}	5,71%
	Lu11	0,9049	1,12%	0,6194	1,98%
	Lu8	0,1503	6,68%	0,2516	6,77%

Примечание. * — $P \leq 0,05$; ** — $P \leq 0,01$; *** — $P \leq 0,001$; P — величина вероятности ошибки при отклонении от нулевой гипотезы; r² — коэффициент детерминации

По результатам анализа установлены два SSR-локуса, которые имели ассоциации с продолжительностью фаз развития на достоверном уровне одновременно в 2018 и 2019 гг.: Lu13 с фазами «всходы – елочка» ($P \leq 0,01$) и «ранняя желтая спелость – желтая спелость» ($P \leq 0,001$), Lu66 с фазой «бутонизация – цветение» ($P \leq 0,001$) (табл. 6). Аддитивная (суммарная) доля влияния значимых локусов составила от 3,45% («всходы – елочка», Lu13) до 10,36% («посев – всходы», Lu8) общей изменчивости признаков (табл. 6). Значения коэффициентов регрессии имели как положительную, так и отрицательную величину.

Заключение

Дефицит влаги в период «всходы – елочка» – «бутонизация – цветение» является лимитирующим фактором получения гарантированного

урожаа льна [27, 28]. В результате проведенного исследования нами установлены два молекулярных маркера (Lu13, Lu66), которые ассоциированы с длительностью фаз вегетативного развития льна масличного «всходы – елочка», «бутонизация – цветение», «ранняя желтая спелость – желтая спелость» при пониженной влагообеспеченности. Установленные положительные и отрицательные значения коэффициента регрессии, полученные при анализе связи микросателлитного локуса с длительностью фазы развития, указывают на возможность отбора растений как с продолжительным периодом указанных фаз развития, так и с коротким периодом, что должно учитываться при выведении сортов льна масличного, устойчивых к дефициту влаги для определенного региона возделывания данной культуры.

Список использованных источников

1. Генетические основы селекции растений. В 4 т. Т. 4. Биотехнология в селекции растений. Геномика и генетическая инженерия / науч. ред. А. В. Кильчевский, Л. В. Хотылева. – Минск : Беларуская навука, 2014. – 653 с.
2. Чесноков, Ю. В. Ассоциативное картирование у растений / Ю. В. Чесноков, А. М. Артемьева // Сельскохозяйственная биология. – 2011, № 5. – С. 3–16.
3. Contreras-Soto, R. I. Genome-Wide Association Study for Agronomic Traits in Soybean Using SNP Markers and SNP Based Haplotype Analysis / R. I. Contreras-Soto [et al.] // PLoS ONE. – 2017. – Vol. 12, № 2. – P. 1–22.
4. Sehgal, D. Quantative trait Loci Mapping in Plants: Concepts and Approaches / D. Sehgal, R. Singh, V. R. Rajpal // Molecular Breeding for Sustainable Crop Improvement, Springer. – 2016. – Chapter 2. – P. 31–59.
5. Association between molecular markers and quantitative traits in an oat germplasm pool: can we infer linkage? / Beer S. C. [et al.] // Journal of Agricultural Genomics. – 1997. – Vol. 3. – P. 197.
6. Predicting quantitative variation within rice germplasm using molecular markers / P. S. Virk [et al.] // Heredity. – 1996. – Vol. 76, № 3. – P. 296–304.
7. Linkage disequilibrium mapping of the bolting gene in sea beet using AFLP markers / M. Hansen [et al.] // Genet. Res. – 2001. – Vol. 77, № 1. – P. 61–66.
8. Linkage Disequilibrium Mapping of Yield and Yield Stability in Modern Spring Barley Cultivars / A. T. W. Kraakman [et al.] // Genetics. – 2004. – Vol. 168, № 1. – P. 435–446.
9. Linkage Disequilibrium Mapping of Morphological, Resistance, and Other Agronomically Relevant Traits in Modern Spring Barley Cultivars / A. T. W. Kraakman [et al.] // Mol Breeding. – 2006. – Vol. 17, № 1. – P. 41–58.
10. RFLP markers associated with major genes controlling heading date evaluated in a barley germ plasm pool / E. Igartua [et al.] // Heredity. – 1999. – Vol. 83, № 5. – P. 551–559.
11. Associations of simple sequence repeats with quantitative trait variation including biotic and abiotic stress tolerance in *Hordeum spontaneum* / V. Ivandic [et al.] // Plant Breeding. – 2008. – Vol. 122. – P. 300–304.
12. Structure of linkage disequilibrium and phenotypic associations in the maize genome / D. L. Remington [et al.] // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2001. – Vol. 98, № 20. – P. 11479–11484.
13. Dwarf8 polymorphisms associate with variation in flowering time / J. M. Thornsberry [et al.] // Nat Genet. – 2001. – Vol. 28, № 3. – P. 286–289.
14. Genome-Wide Association Study and Selection Signatures Detect Genomic Regions Associated with Seed Yield and Oil Quality in Flax / F. You [et al.] // IJMS. – 2018. – Vol. 19, № 8. – P. 2303.
15. Дьяков, А. Б. Физиология и экология льна / А. Б. Дьяков. – Краснодар, 2006. – 224 с.
16. Фадеева, Т. М. Возрастные изменения растений льна в онтогенезе / Т. М. Фадеева, Е. Ф. Семенова // Научные ведомости. Естественные науки. – 2011, №9 (104) – С. 50–55.
17. Использование физиологических параметров растения льна масличного в селекции: рекомендации / Н. А. Дуктова [и др.] – Горки : БГСХА, 2014. – 44 с.
18. Characterization of novel genic SSR markers in *Linum usitatissimum* (L.) and their transferability across eleven *Linum* species / B. J. Soto-Cerdal, H. U. Saavedra, C. N. Navarro, P. M. Ortega // Electronic Journal of Biotechnology. doi: 10.2225/vol14-issue2-fulltext-6.
19. Deng, X. Isolation and characterization of polymorphic microsatellite markers from flax / X. Deng [et al.] // Afr. J. Biotech. – Vol. 10, № 5. – P. 734–739.
20. Peakall, R. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research—an update / R. Peakall, P. E. Smouse // Bioinformatics. – 2012. – Vol. 28, № 19. – P. 2537–2539.
21. Nei, M. Analysis of gene diversity in subdivided populations / M. Nei // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. – 1973. – Vol. 70, № 12. – P. 3321–3323.
22. DARwin – Dissimilarity Analysis and Representation for Windows [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://darwin.cirad.fr/>. – Дата доступа: 12.12.2018.
23. Pritchard, J. K. Inference of population structure using multilocus genotype data / J. K. Pritchard, M. Stephens, P. Donnelly // Genetics. – 2000. – Vol. 155, № 2. – P. 945–959.

24. Evanno, G. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study / G. Evanno, S. Regnaut, J. Goudet // *Mol. Ecol.* – 2005. – Vol. 14, № 8. – P. 2611–2620.
25. Earl, D. A. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method / D. A. Earl, B. M. vonHoldt // *Conservation Genetics Resources.* – 2012. – Vol. 4, № 2. – P. 359–361.
26. TASSEL: software for association mapping of complex traits in diverse samples / P. J. Bradbury [et al.] // *Bioinformatics.* – 2007. – Vol. 23, № 19. – P. 2633–2635.
27. Объедков М.Г. Лен-долгунец. М., 1979. – 222 с.
28. Роль генофонда льна в селекции на адаптивность. / Т. А. Рожмина [и др.] // *Успехи современной науки.* – 2017. – Vol. 1, № 10. – P. 184–189.

E. V. Guzenko, M. V. Bogdanova, V. I. Sakovich, V. A. Lemesh

SEARCH FOR MICROSATELLITE LOCI ASSOCIATED WITH A PERIOD OF DEVELOPMENT PHASES UNDER THE CONDITIONS OF REDUCED WATER AVAILABILITY IN OIL FLAX (*LINUM USITATISSIMUM* L.)

State Scientific Institution

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

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

e-mail: e.guzenko@igc.by

Results of associative mapping in the analysis of a collection of oil flax of different geographical origin (23 countries) are demonstrated. Using microsatellite markers, high genetic heterogeneity of the collection was established. The polymorphism information content (PIC) averaged 0.362 per locus, and the frequency of most alleles was less than 50%. In total, out of 168 alleles identified in 12 SSR loci, 36 were unique. Depending on the locus, the number of unique alleles varied from one (loci Lu10, Lu13) to seven (Lu25, Lu4). To analyze associations, the TASSEL 2.1 software was used. Two SSR loci associated with a period of oil flax development phases at a significant level of confidence: Lu13 with “seedlings – herringbone” ($P \leq 0.01$) and “early yellow ripeness – yellow ripeness” ($P \leq 0.001$) phases and Lu66 with the “budding – blooming” ($P \leq 0.001$) phase were identified. During these vegetative stages, drought is a limiting factor for a guaranteed yield of oil flax. The established positive and negative values of a regression effect of alleles indicate the possibility of selecting plants with both a long period of indicated development phases and a short period that should be taken into account when breeding drought-resistant oil flax varieties for various agroclimatic conditions.

Keywords: oil flax, development phases, drought resistance, genetic heterogeneity, SSR markers.

Дата поступления статьи: 25 сентября 2020 г.

П. С. Кирьянов, О. Ю. Баранов

СТРУКТУРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ГЕНОВ 18S И 28S РИБОСОМНОЙ РНК КАРЕЛЬСКОЙ БЕРЕЗЫ

¹Государственное научное учреждение «Институт леса Национальной академии наук Беларуси»
Республика Беларусь, 246050, г. Гомель, ул. Пролетарская, 71
e-mail: PKirjanov@yandex.ru

В статье представлены результаты секвенирования генов 18S и 28S рибосомной РНК карельской березы и их транскриптов. Показано, что их организация и первичная структура являются сходными с *Betulaceae*. Сравнительный анализ множественных прочтений позволил идентифицировать нуклеотидный полиморфизм среди копий генов в пределах индивидуального дерева карельской березы. В ходе сравнительного анализа первичных структур генов 18S и 28S рибосомной РНК *Betula pendula* var. *carelica* и *Arabidopsis thaliana* охарактеризованы особенности нуклеотидных различий между таксонами.

Ключевые слова: гены рибосомной РНК, высокопроизводительное секвенирование, карельская береза, нуклеотидный полиморфизм.

Введение

Карельская береза (*Betula pendula* Roth. var. *carelica* Mercl.), согласно текущему систематическому статусу, представляет собой разновидность березы повислой ($2n = 28$), характерной особенностью которой является наличие узорчатой текстуры древесины. Происхождение «узорчатого» фенотипа обусловлено протеканием процессов аномального ксилогенеза, выражающихся в изменении пространственной ориентации проводящих сосудистых элементов и повышенной паренхиматизации тканей [1]. В то же время использование данной морфолого-анатомической аномалии в качестве единственного таксономического критерия сопряжено с рядом противоречий, поскольку аналогичный тип текстуры древесины может встречаться и у близкородственного ей тетраплоидного ($4n = 56$) вида — березы пушистой (*B. pubescens* Ehrh.), а также у триплоидных растений ($3n = 42$), представляющих собой, как правило, межвидовые гибриды *B. pendula* × *pubescens* [2]. Кроме того, следует отметить, что узорчатость древесины является количественным признаком, проявление которого имеет приуроченность к определенным габитуальным формам деревьев [3]. Наследственные основы предрасположенности к аномальному ксилогенезу до конца остаются невыясненными, однако, как отмечает

большинство исследователей, они имеют комплексную природу, включая эпигенетические механизмы и взаимодействие неаллельных генов [4, 5]. Остаются открытыми вопросы и о происхождении и систематическом положении карельской березы [6]. Среди представленных к обсуждению гипотез появления карельской березы, на наш взгляд, следует особо выделить гибридогенную, объясняющую генез *B. pendula* var. *carelica* путем интрогрессии предковых видов берез или за счет интерградации аллопатрических популяций *B. pendula* [5]. В пользу данной гипотезы могут свидетельствовать полученные нами ранее молекулярно-генетические данные, указывающие на наличие прямой зависимости степени проявления узорчатости древесины от уровня наблюдаемой гетерозиготности по ряду локусов ядерного генома [7]. В то же время для подтверждения гибридогенной гипотезы необходим поиск дополнительных наследственных признаков и детерминант, характеризующихся высокой степенью информативности применительно к филогенетическим исследованиям.

Гены рибосомной ДНК являются одним из наиболее изученных участков генома у различных живых организмов [8]. С одной стороны, это обусловлено их высокой представленностью как в наследственном аппарате клетки, вследствие высокой степени их копий-

ности, формирования множественных рДНК-содержащих экстрахромосомных фрагментов, наибольшего удельного веса в транскриптоме (85–98%), так и рядом структурно-функциональных особенностей, определяющих их значимость в качестве молекулярно-генетических маркеров для проведения не только филогенетических и таксономических, но и физиологических исследований (включая анализ процессов деления и дифференциации клеток) [9].

Характерной чертой генов рДНК является их высокая степень консерватизма в пределах видовых таксонов, наличие устойчивых дискретных различий на надвидовом уровне, единообразие нуклеотидной структуры и согласованность филогенетических преобразований в пределах региона tandemно повторяющихся копий [8].

До последнего времени локусы рДНК являлись одними из распространенных маркеров для проведения видовой идентификации живых организмов, что послужило значительному накоплению данных о нуклеотидных последовательностях различных представителей прокариот и эукариот [10, 11]. В то же время, несмотря на высокую информативность данных генетических маркеров, накопление у них дискретных молекулярных отличий в ходе видообразования происходит значительно медленнее по сравнению с процессами формирования репродуктивного барьера или возникновением систематически значимых морфолого-анатомических, физиологических, кариотипических и других особенностей [12, 13]. На наш взгляд, несоответствие между молекулярно-генетическими и фенотипическими (структурными или функциональными) данными в случае анализа близкородственных таксонов, по всей видимости, отражает не противоречие данных критериев, а указывает на необходимость пересмотра существующей концепции вида и актуализации вопросов, связанных с видообразованием [14]. Так, например, согласно современной эволюционной концепции, заключительной стадией видообразования является формирование репродуктивного барьера, затрудняющего обмен генетической информацией между возникшими таксонами, что впоследствии способно усиливать процессы межвидовой диф-

ференциации [15]. В то же время в качестве основы репродуктивной изоляции зачастую выступает ограниченное число морфофизиологических или цитологических различий, действия которых может быть нивелировано при воздействии ряда сторонних факторов — мейотические нарушения при гаметогенезе способны обеспечивать скрещивание видов с различным уровнем пloidности или определять частичную фертильность их гибридов; колебания климатических факторов позволяют устранять фенологические различия; изменение гормонального статуса в генеративных органах делает возможным прорастание чужеродных пыльцевых зерен и протекание процессов сингамии и т. д. [16]. Кроме того, гибридные особи могут быть получены и искусственными способами — за счет направленного оплодотворения в условиях *in vivo* и *in vitro* или путем слияния протопластов соматических клеток на основании использования различных биотехнологических подходов [17]. В то же время, несмотря на возможность достижения стадии оплодотворения, несоответствие между видами по ряду признаков и свойств, относящихся к основным клеточным процессам (репликации, транскрипции, трансляции, первичному метаболизму и др.) делают невозможным получение жизнеспособных гибридных форм [18].

Несмотря на широкую изученность рДНК у различных растительных видов, установление первичной структуры транскрибируемых и нетранскрибируемых последовательностей применительно к *Betula* spp. (в т. ч. и *B. pendula* var. *carelica*) до настоящего времени было выполнено (за исключением *B. platyphylla*) только для внутренних спейсеров ITS1 и ITS2 и гена 5,8S РНК, составляющих менее 10% от размера всего оперона [19]. Также не были проведены оценка существующих генетических вариаций среди различных копий генов рДНК и анализ выявляемых таксоноспецифичных SNP (однонуклеотидных полиморфизмов) в пределах *Betula*. Отсутствие экспериментальных данных о нуклеотидной последовательности и структурной организации генов 18S и 28S рРНК *B. pendula* var. *carelica* ограничивают возможность их использования в качестве потенциальных маркеров для проведения филогенетических

исследований и выявление ассоциаций с процессами аномального ксилогенеза.

Исходя из всего вышесказанного, цель данной работы — охарактеризовать структурную организацию генов 18S и 28S рибосомной РНК карельской березы, провести сравнительный анализ исходных генов и их транскриптов на предмет поиска модификаций рРНК в ходе процессинга, изучить нуклеотидные вариаций копий tandemных повторов и оценить уровень генетической дифференциации по отношению к близкородственным таксонам.

Материалы и методы

Экспериментальный материал для проведения молекулярно-генетических исследований был собран на опытной плантации клонированных растений карельской березы (выд. 8 кв. 43 Зябровского лесничества Корневской экспериментальной лесной базы Института леса НАН Беларуси, площадь — 0,32 га, год создания — 2008). Дополнительно для проведения сравнительного анализа был собран материал в расположенных рядом лесных культурах березы повислой. Общее число деревьев составило: 10 шт. — карельская береза, 10 шт. — береза повислая. Экспериментальный материал представлял собой фрагменты (70 см) ствола дерева или ветвей первого порядка, содержащих не менее одного узлового сегмента (основная зона протекания процессов аномального ксилогенеза) и двух междоузлий. В лабораторных условиях свежесобранные осевые органы каждого дерева



Рис. 1. Фрагменты препарированных и нативных образцов осевых побегов березы повислой (вверху) и карельской березы (внизу)

фрагментировали на участки, содержащие по отдельности узел и междоузлие, из которых затем удалялись ткани филлемы и флоэмы и приготавливались образцы соскобов, содержащих биологический материал камбия и наружного слоя ксилемы (рис. 1). Далее образцы (40 шт.) соскобов после соответствующей пробоподготовки использовались для получения по отдельности препаратов суммарной ДНК и РНК (кДНК) согласно протоколам, представленным в работах [20–22].

Для всех образцов ДНК и кДНК (80 шт.), с использованием набора универсальных праймеров PNS1 и ITS2, 5,8SR и revLR12R, были получены ампликоны, содержащие гены 18S и 28S рРНК [23]. Последующий анализ ампликонов осуществлялся путем фрагментарного (600–800 н. о.) секвенирования (по методу Сэнгера) регионов генов с применением дополнительных праймеров SR7, SR2, SR10R, NS6 и LR3R, LR7, R LR10R [23] на платформе Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific, США) согласно протоколам, рекомендуемым компанией-изготовителем. Четыре образца кДНК, полученные от двух деревьев ((береза повислая (узел), береза повислая (междоузлие), карельская береза (узел), карельская береза (междоузлие)), были использованы для создания транскриптомных библиотек и их дальнейшего высокопроизводительного секвенирования базе Ion PGM Torrent System (Thermo Fisher Scientific, США). Первоначальную обработку данных, поступающих от Ion PGM Torrent System, осуществляли в автоматическом режиме при помощи программного обеспечения Torrent Suite v. 5.8 (Thermo Scientific, США). *De novo* сборку секвенированных последовательностей выполняли с помощью программного обеспечения Unipro UGENE v. 1.29.0. Выравнивание последовательностей и анализ нуклеотидного состава генов осуществляли с применением программы CLC Sequence Viewer v.6. Выявление и картирование структурных доменов выполняли с помощью онлайн сервиса MAFFT v.7. на основании сопоставления результатов сборки с различными последовательностями генов 18S и 28S рРНК эукариотических (установление переменных регионов (V)), 16S и 23S рРНК прокариотических (идентификация сегментов экспансии (ES)) организмов, представленных в

NCBI GenBank. Проведение генетико-таксономического анализа и построение дендрограмм осуществляли с помощью онлайн сервиса NCBI nucleotide BLAST. Создание и анализ 2D моделей рРНК выполняли на основании онлайн платформы Mfold Web Server.

Результаты и обсуждение

В ходе *de novo* сборки последовательностей, полученных в результате секвенирования ампликонов, для всех исследованных образцов были получены первичные структуры генов 18S (1809 н. о.) и 28S (3397 н. о.) рРНК. Проведенный сравнительный анализ каждого из генов выявил идентичность их структур между всеми изученными деревьями *B. pendula* var. *carelica* и *B. pendula*. Выравнивание последовательностей, полученных для препаратов ДНК и кДНК, также показало их идентичность, что указывает на отсутствие выраженных процессов модификации первичных структур транскриптов генов 18S и 28S рРНК в ходе процессинга. Исходя из полученных результатов, в дальнейших исследованиях были использована только *B. pendula* var. *carelica*. Нуклеотидные последовательности генов были депонированы в международной базе данных GeneBank NCBI (номера записей MT122805 (18S рРНК) и MT122799 (28S рРНК)) [19].

Нуклеотидный состав гена 18S рРНК был следующим (плюсовая цепь): А — 24,8%, Ц — 22,2%, Г — 27,6%, Т — 25,5%, ГЦ — 49,8%. Распределение участков с повышенным содержанием АТ/ГЦ оснований носило дисперсно-кластерный характер (рис. 2). Доменная структура гена включала восемь переменных регионов ($V_{(1-8)}$) и 12 сегментов

экспансии ($ES_{S(1-12)}$), что является аналогичным другим растительными и грибным организмам [24, 25].

Долевое участие нуклеотидных оснований в гене 28S рРНК (плюсовая цепь) составило: А — 23,2%, Ц — 25,1%, Г — 31,9%, Т — 19,8%, ГЦ — 56,9%. Распределение регионов с повышенным содержанием АТ/ГЦ оснований, как и в случае гена 18S РНК, также носило дисперсно-кластерный характер (рис. 2). В структуре гена 28S РНК было выявлено наличие 41 сегмента экспансии ($ES_{L(1-41)}$), расположение и общее число которых было также в целом сходным с другими эукариотическими организмами грибного и растительного происхождения [26].

В результате *de novo* сборки прочтений для каждой из четырех кДНК библиотек берез было получено от 28 до 32 тысяч последовательностей разной длины и уровня прочтения, в которых были идентифицированы транскрипты генов 18S и 28S рРНК. Анализ структурных различий, выявляемых между прочтениями (отражают первичную структуру отдельных копий генов) показал, что они представлены в основном мононуклеотидными заменами и делециями (рис. 3). При этом встречаемость замен среди копий генов 18S и 28S РНК *B. pendula* var. *carelica* была сходной и составляла в среднем каждые 3,64 и 3,68 позиций на 100 нуклеотидов соответственно с представленностью 1,66% и 1,72% от общего числа прочтений. Аналогичные результаты были получены и для *B. pendula*. В то же время, исходя из того факта, что у древесных растений области рДНК расположены в нескольких группах сцепления (хромосомах), данные об изменчивости, выявляемой при

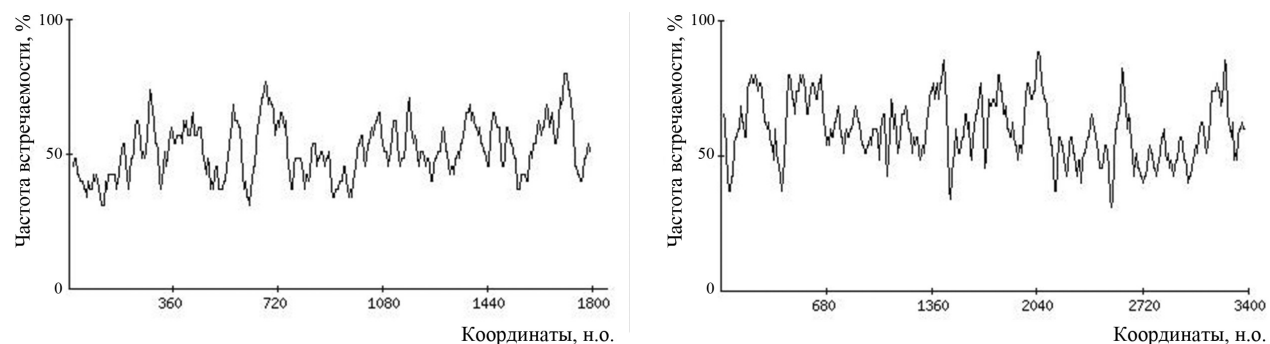


Рис. 2. Графическое изображение распределения ГЦ-насыщенных регионов для генов 18S (слева) и 28S (справа) рРНК карельской березы

сопоставлении последовательностей прочтений, могут относиться как к одному кластеру, так и к различным [27]. В ряде случаев представленность последовательностей прочтений, содержащих альтернативные варианты, составляла порядка 30%, что также может быть связано с гетерогенностью копий внутри кластера или различиями, выявляемыми между регионами гомологичных или негомологичных хромосом.

Анализ последовательностей генов 18S и 28S рРНК карельской березы в международной базе данных NCBI GeneBank показал, что наибольшим уровнем сходства с ними, помимо *Betula spp.*, характеризовались виды близкородственного рода *Alnus L.* (Ольха) [19]. При этом различия по гену 18S рРНК в пределах *Betula* отсутствовали, а уровень генетической дифференциации (D) для обоих генов в случае сравнения с разными видами ольх не превысил 0,6% (рис. 4). Детальный анализ диагностируемых различий между таксонами *Betula* и *Alnus* показал, что они носят в основном родоспецифический характер и представляют собой нуклеотидные замены (10 SNPs для гена 18S РНК, 16 — для гена 28S РНК), не приводящие к изменению размера генов.

Кроме рассмотрения общего уровня дифференциации, используемого, как правило, в качестве основного критерия для оценки генетико-таксономических взаимоотношений, в ходе исследований был дополнительно изучен и непосредственно характер выявляемых нуклеотидных различий. Согласно литературным данным, одним из предполагаемых механизмов формирования молекулярных видоспецифических признаков, является оптимизация (путем отбора) термодинамической или функциональной структуры ДНК применительно к текущей биологической системе или ее отдельным элементам [28]. Также особенности строения ферментов (или их комплексов) системы репликации у того или иного вида могут определять предпочтительность возникновения наследственных изменений определенного характера [28].

В качестве молекулярных маркеров для проведения исследований в данной области, на наш взгляд, в наибольшей степени подходят гены рибосомной ДНК, информативность которых обусловлена сочетанием в себе преимуществ как белок-кодирующих генов (относительная консервативность, сопряженность с базовыми процессами в клетке), так и не-

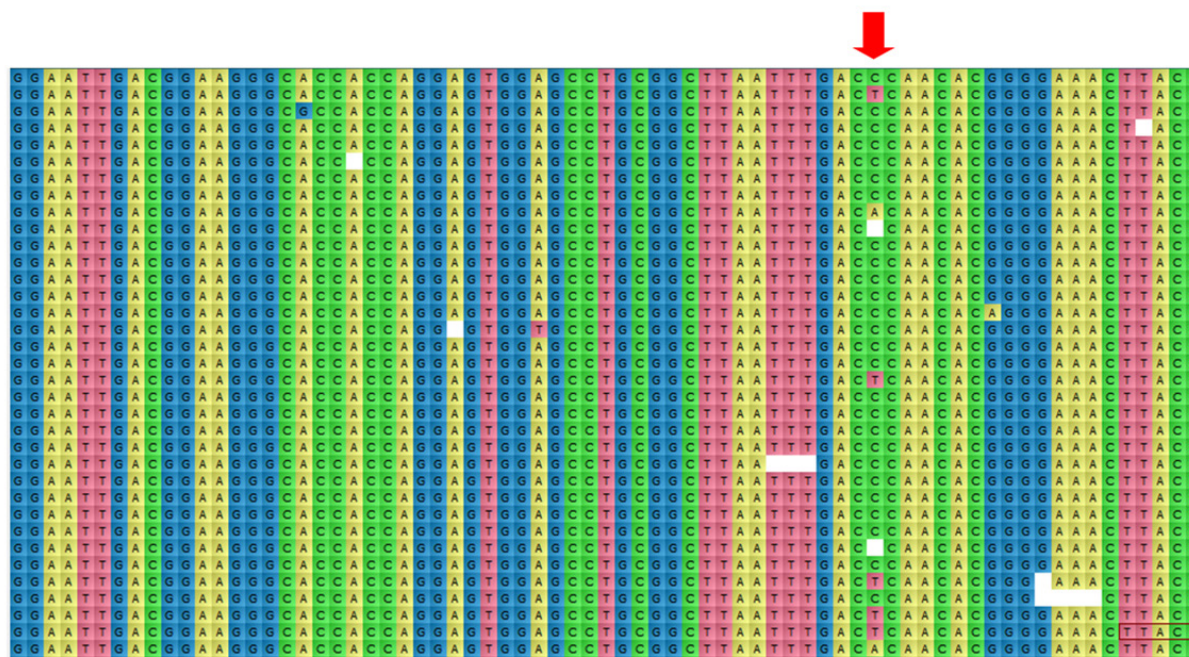


Рис. 3. Выравнивание последовательностей прочтений транскрипта гена 18S РНК дерева карельской березы (ткани междоузлия), содержащих полиморфные нуклеотидные варианты (стрелкой отмечены позиции с высокой степенью представленностью SNPs между прочтениями)

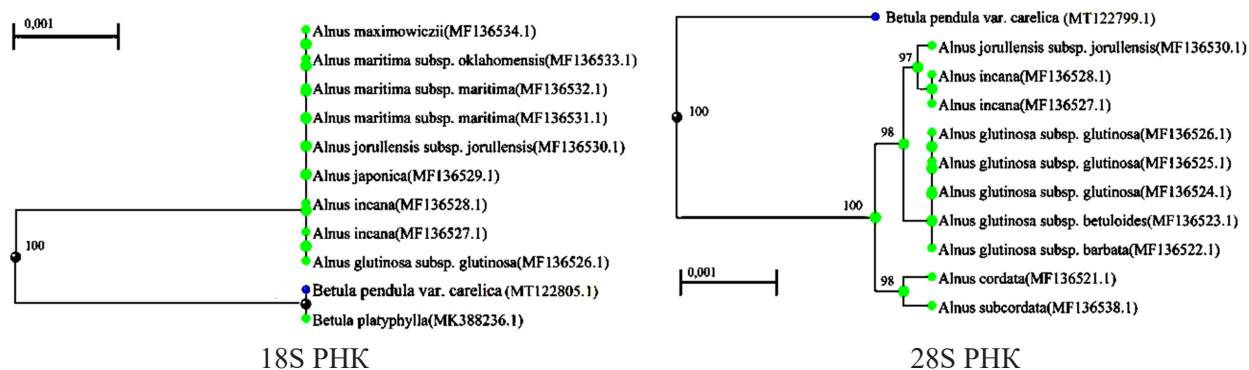


Рис. 4. Дендрограмма, иллюстрирующая степень генетической дифференциации (D), между *Betula* spp. и *Alnus* spp. (в узлах ветвей приведены значения бутстрэпа, n = 100)

транслируемых последовательностей (отбору непосредственно подвержена первичная или вторичная структура дезоксирибонуклеиновой кислоты или химически сходного с ней транскрипта, что в свою очередь определяется характером взаимодействия рРНК с рибосомными белками, а также свойствами их комплексов) [8]. Для белок-кодирующих генов значительная часть отбора ориентирована на изменения в полипептидной цепи, которые в основном и являются фактором, определяющим вариации в структуре ДНК по принципу обратной связи, что определяет несоответствие между истинными мутационными событиями и вариациями, закрепляющимися в потомстве [29]. Изменчивость некодирующих участков ДНК отражает большую часть спектра мутационных изменений, однако анализ данных локусов ограничен только возможностью изучения близкородственных групп организмов вследствие низкой вероятности выявления ортологичных последовательностей среди дальнеродственных таксонов [30].

В качестве рабочей гипотезы было выдвинуто предположение, что изменения нуклеотидных последовательностей генов 18S и 28S рРНК, характеризующихся сходным перечнем структурно-функциональных характеристик, должны протекать по аналогичному принципу. В поддержку данного предположения может выступать теория мутационного давления Суюеки, постулирующая предпочтительную направленность нуклеотидных изменений у той или иной таксономической группы [31]. В большинстве случаев у живых организмов выявлены два основных направления: GC- и AT-давление, при этом

транзиции (A↔G; T↔C) происходят чаще, чем трансверсии (A↔C; G↔T) [28]. С одной стороны, направленность изменений нуклеотидной цепи может определяться текущей последовательностью ДНК, характеризующейся определенными термодинамическими параметрами, и, как следствие, способностью образовывать специфические конформационные структуры в одноцепочечной и спаренной форме, оказывающих влияние на взаимодействие с ферментативным комплексом репликационной вилки. С другой стороны, как было показано большим количеством исследований, таксоноспецифические особенности полипептидной структуры факторов репликации ДНК оказывают существенное влияние на формирования ошибок определенного характера [32–34]. При этом дополнительным моментом, усиливающим различия между таксонами, является наивысший уровень внутривидового консерватизма для генов, детерминирующих процессы репликации и транскрипции по сравнению с другими структурными и регуляторными генами [34]. Таким образом, установление закономерностей формирования структуры нуклеотидных последовательностей, включая выявление зависимости характера точечных мутаций от окружающего их нуклеотидного контекста, на наш взгляд, может явиться основой для разработки новых молекулярно-генетических подходов и критериев в таксономии и оценки процессов видообразования.

Исходя из филогенетически недавнего происхождения и соответственно низкого уровня генетических различий между *Betula* и *Alnus* [35], использование их в качестве

модельных объектов для изучения закономерностей формирования нуклеотидных изменений генов рДНК является низкоинформативным ($D < 0,6\%$). Вследствие этого нами для проведения сравнительного анализа было выбрано сочетание дальнеродственных таксонов *Betula pendula* var. *carelica* – *Arabidopsis thaliana*, степень генетической дифференциации между которыми была более значимой и составила 3% (55 замен) для гена 18S РНК, и 5% (170 замен) для гена 28S РНК. Кроме нуклеотидных замен, по результатам выравнивания последовательностей, было выявлено наличие 5 разрывов (gap) для гена 18S РНК, 18 разрывов — для гена 28S РНК. При этом разрывы выявлялись как у карельской березы, так и резуховидки Таля, что и обусловило относительно одинаковую длину сравниваемых ортологичных генов. Суммарная статистика мононуклеотидного полиморфизма, не связанного с делециями, инсерциями и комплексной перестройкой локальных регионов, приведена в таблице.

Как следует из таблицы, характер различий как в пределах каждого из генов, так и между ними не являлся произвольным, а имел определенную направленность. Так, наименьшая способность к замещению была выявлена для позиций карельской березы, содержащих

А-нуклеотид: 1 на 301,5 оснований (18S) и 1 на 147,7 оснований (28S). В то же время для других типов позиций данная величина была ниже и составила для Г-нуклеотида — 226,1 и 89,4, Т — 120,6 и 94,4, Ц — 100,5 и 70,8 соответственно. Наименьший уровень различий, связанный с транзициями, также отмечен для А-нуклеотида — 33,3% (18S) и 47,8% (28S). Несколько большее число транзиций установлено для Т — 66,7% и 55,6%. Г→А замены были более выражены в гене 18S РНК (87,5%), чем в 28S РНК (52,6%). Наивысшая доля транзиций была установлена для Ц-нуклеотида — 88,8% и 77,0%.

Однако в целом анализ полученных данных о типах и представленности нуклеотидных отличий указывает на определенную компенсаторность замен в модельной системе *B. pendula* var. *carelica* – *A. thaliana*, что и определило относительное постоянство соотношения вариантов азотистых оснований в рДНК между таксонами. Так, первичная структура генов рДНК *A. thaliana* только незначительно (в среднем не более 2% в относительных единицах) отличалась от *B. pendula* var. *carelica* и составила: для 18S РНК – А (25,1%), Ц (21,8%), Г (27,4%), Т (25,7%), ГЦ (49,3%); гена 28S РНК – А (23,6%), Ц (24,5%), Г (31,4%), Т (20,5%), ГЦ (55,9%) [19].

Таблица

Распределение альтернативных нуклеотидных вариантов *A. thaliana* по отношению к аналогичным позициям *B. pendula* var. *carelica* (в абсолютном исчислении)

Нуклеотидные основания <i>B. pendula</i> var. <i>carelica</i>	Нуклеотидные основания <i>A. thaliana</i>			
	А	Т	Г	Ц
18S				
А	-	1 (1/0)	2 (1/1)	3 (3/0)
Т	3 (2/1)	-	2 (2/0)	10 (6/4)
Г	7 (3/4)	0 (0/0)	-	1 (1/0)
Ц	1 (1/0)	16 (11/5)	1 (0/1)	-
28S				
А	-	5 (4/1)	11 (5/6)	7 (6/1)
Т	10 (8/2)	-	6 (4/2)	20 (16/4)
Г	20 (14/6)	15 (14/1)	-	3 (2/1)
Ц	8 (8/0)	37 (31/6)	3 (3/0)	-

Примечание. В скобках приведены данные соотношения локализации замен в составе олигонуклеотидных последовательностей (формирующих/не формирующих) вторичную структуру

Среди факторов, относящихся к особенностям структуры ДНК, оказывающих влияние на точность процессов репликации, способность к образованию вторичной структуры играет значимую роль [32]. Построение 2D пространственных моделей с помощью специализированного программного обеспечения показало, что 65,9% (18S) и 79,3% (28S) из проанализированных олигонуклеотидных последовательностей, содержащих видоспецифические SNP, способны формировать спарен-

Как видно из рисунка 5, переменные нуклеотидные позиции были расположены в шпильковидных конформациях как в спаренном, так и неспаренном состоянии. Проведенный анализ более длинных последовательностей показал, что, несмотря на формируемые таксономические отличия, в целом центр симметрии самокомплементарных последовательностей сохранялся, что может свидетельствовать об определенном влиянии вторичной структуры макромолекулы на характер и локализацию типов нуклеотидных изменений (рис. 6) [36].

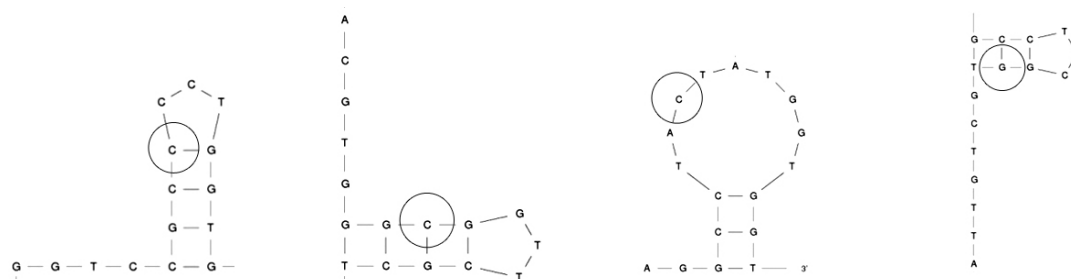
[illegible]

Рис. 6. Выравнивание и схематическое отображение вторичной структуры (формат Vienna) фрагментов последовательностей генов рДНК карельской березы и резуховидки Таля (нуклеотидные основания в местах межвидовых различий дифференцированы по цвету)

Заключение

Изучение структурной организации генов 18S и 28S РНК *B. pendula* var. *carelica* показало, что она является сходной по строению с аналогичными генами грибных и растительных организмов. В ходе оценки генетической гетерогенности генов в пределах индивидуальных растений установлено, что, несмотря на общий высокий уровень консерватизма ($p_{\text{SNP}} < 0.08\%$), нуклеотидные различия наблюдаются среди их копий. Нуклеотидные различия с генами рРНК *B. pendula* и *B. platyphylla* не выявлены, уровень генетической дифференциации применительно к *Alnus* spp. не превысил 0,6%. На основании изучения модельной генетической системы *B. pendula* var. *carelica* — *A. thaliana* охарактеризованы особенности нуклеотидных различий генов 18S и 28S РНК между таксонами.

Исследование выполнено при поддержке гранта БРФФИ Б20М-060.

Список использованных источников

1. Ветчинникова, Л. В. Карельская береза и другие редкие представители рода *Betula* L. / Л. В. Ветчинникова. — М.: Наука, 2005. — 269 с.
2. Буторина, А. К. О природе узорчатости древесины у карельской березы / А. К. Буторина // Генетические и экологические основы повышения продуктивности лесов: сборник научных трудов. Воронеж: НИИЛ-ГиС. — 1993. — С. 40–47.
3. Барсукова, Т. Л. Береза карельская в Белоруссии / Т. Л. Барсукова // Сельское хозяйство Белоруссии. — 1986. — № 8. — С. 38–45.
4. Коровин, В. В., Структурные аномалии стебля древесных растений - 2-е изд / В. В. Коровин, Л. Л. Новицкая, Г. А. Курносов. — М.: МГУЛ, 2003. — 280 с.
5. Ветчинникова, Л. В., Титов А. Ф., Кузнецова Т. Ю. Карельская береза: биологические особенности, динамика ресурсов и воспроизводство: монография / Институт леса КарНЦ РАН, Институт биологии КарНЦ РАН. — Петрозаводск: Карельский научный центр РАН, 2013. — 312 с.
6. Ветчинникова, Л. В. Карельская береза: разновидность или самостоятельный вид? / Л. В. Ветчинникова, А. Ф. Титов // Изв. вузов. Лесн. журн., 2020. — № 1. — С. 26–48. doi: 10.37482/0536-1036-2020-1-26-48.
7. Кирьянов, П. С. Молекулярно-генетические подходы к идентификации межвидовых и внутривидовых гибридов берез Восточно-Европейского региона / П. С. Кирьянов [и др.] // Молекулярная и прикладная генетика, 2019. — Т. 26. — С. 45–55.
8. Hamby, R. K. Ribosomal RNA as a phylogenetic tool in plant systematics / R. K. Hamby, E. A. Zimmer // Molecular systematics of plants. Springer. — Boston, 1992. — P. 50–91.
9. Rogers, S. O. Ribosomal RNA genes in plants: variability in copy number and in the intergenic spacer / S.O. Rogers, A. J. Bendich // Plant Molecular Biology, 1987. — Vol. 9, № 5. — P. 509–520.
10. Schaal, B. A. Ribosomal DNA variation within and among plant populations / B. A. Schaal, G. H. Learn Jr. // Annals of the Missouri Botanical Garden, 1988. — Vol. 75, № 4. — P. 1207–1216.
11. Liao, D. Gene conversion drives within genic sequences: concerted evolution of ribosomal RNA genes in bacteria and archaea / D. Liao // Journal of Molecular Evolution, 2000. — Vol. 51, № 4. — P. 305–317.
12. Hillis, D. M. Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference / D. M. Hillis, M. T. Dixon // The Quarterly review of biology, 1991. — Vol. 66, № 4. — P. 411–453.
13. Wendel, J. F. Phylogenetic incongruence: window into genome history and molecular evolution / J. F. Wendel, J. J. Doyle // Molecular systematics of plants, 1998. — Vol. 2. — P. 265–296.
14. Старобогатов, Я. И. Проблема видообразования / Я. И. Старобогатов. — Итоги науки и техники. Серия «Общая геология». — М.: ВИНТИ, 1985. — 94 с.
15. Пугачев, О. П. Вид и видообразование. Анализ новых взглядов и тенденций / О. П. Пугачев. — Санкт-Петербург: Зоол. Инст. РАН, 2009. — 304 с.
16. Ellstrand, N. C. Distribution of spontaneous plant hybrids / N. C. Ellstrand, R. Whitkus, L. H. Rieseberg // Proceedings of the National Academy of Sciences, 1996. — Vol. 93, № 10. — P. 5090–5093.
17. Davey, M. R. Plant protoplasts: status and biotechnological perspectives / M.R. Davey [et al.] // Biotechnology advances. — 2005. — Vol. 23, № 2. — P. 131–171.

18. Grosser, J. W. Observations and suggestions for improving somatic hybridization by plant protoplast isolation, fusion, and culture / J. W. Grosser // *HortScience*, 1994. – Vol. 29, № 11. – P. 1241–1242.
19. National center for biotechnology information [Electronic resource]. – Mode of access: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>. – Date of access: 17.03.2020.
20. Баранов, О. Ю. Генетические механизмы коэволюции в системе «хозяин-паразит» (на примере древесных растений и фитопатогенных грибов лесных ценозов Беларуси): диссертация доктора биологических наук: 03.02.07 – генетика: защищена 21.12.2017, утверждена: 16.06.2018 – Гомель, 2017 – 332 с.
21. Searching for active mobile genetic elements in dsRNA fraction of *Pinus sylvestris* having witches broom abnormalities // A. A. Pochtovyy [et al.] // *Genomics Data*, 2017 – Vol. 12. – P. 102–108.
22. Можаровская, Л. В. Структурно-функциональный анализ локусов, кодирующих антимикробные пептиды сосны обыкновенной / Л. В. Можаровская // Молекулярная и прикладная генетика: сб. науч. тр. / Институт генетики и цитологии НАН Беларуси; редкол.: А. В. Кильчевский (гл. ред.) [и др.]. – Минск: Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, 2018. – Т. 25. – С. 83–91.
23. White, T. J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics / T. J. White [et al.] // *PCR Protocols: A guide to methods and applications* / ed.: M. A. Innis [et al.]. – New York, 1990. – P. 315–322.
24. Ki, J.-S. Hypervariable regions (V1–V9) of the dinoflagellate 18S rRNA using a large dataset for marker considerations / J.-S. Ki // *Journal of Applied Phycology*, 2011. – Vol. 24, № 5. – P. 1035–1043.
25. Mankin, A. S. Identification of ten additional nucleotides in the primary structure of yeast 18S rRNA / A. S. Mankin, K. G. Skryabin, P. M. Rubtsov // *Gene*, 1986. – Vol. 44, № 1. – P. 143–145.
26. Kuzoff, R. K. The phylogenetic potential of entire 26S rDNA sequences in plants / R. K. Kuzoff [et al.] // *Molecular Biology and Evolution*. – 1998. – Vol. 15, № 3. – P. 251–263.
27. Muir, G. Three divergent rDNA clusters predate the species divergence in *Quercus petraea* (Matt.) Liebl. and *Quercus robur* L / G. Muir, C. C. Fleming, C. Schlötterer // *Molecular Biology and Evolution*, 2001. – Vol. 18, № 2. – P. 112–119.
28. Хрусталеv, В. В. Биохимические механизмы мутационного давления в методологии вычислительной биологии / В. В. Хрусталеv. – Мн.: М-во здравоохранения Респ. Беларусь, Белорус. гос. мед. ун-т, каф. общ. химии, 2010. – 211 с.
29. Taylor, J. H. Patterns and Mechanisms of Genetic recombination / J. H. Taylor // *Molecular genetics* / J. H. Taylor. – New York, 1967. – P. 95–136.
30. Which DNA marker for which purpose : final compendium of the research project / DGXII Biotechnology FW IV Research Programme ; ed. E. M. Gillet. – Frankfurt, 1999. – 253 p.
31. Sueoka, N. Directional mutation pressure and neutral molecular evolution / N. Sueoka // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 1988. – Vol. 85, № 8. – P. 2653–2657.
32. Moore, G. P. The frequency of matching sequences in DNA / G. P. Moore, A. R. Moore, L. I. Grossman // *J. Theor. Biol.* – 1984. – Vol. 108, № 1. – P. 111–122.
33. Sinden, R. R. DNA structure, mutations, and human genetic disease / R. R. Sinden, R. D. Wells // *Curr. Opin. Biotechnol.* – 1992. – Vol. 3, № 6. – P. 612–622.
34. Futuyma, D. J. *Evolutionary Biology* / D. J. Futuyma. – 3rd ed. – Sunderland : Sinauer Associates, 1998. – 751 p.
35. Chen, Z. D. Phylogeny and evolution of the Betulaceae as inferred from DNA sequences, morphology, and paleobotany / Z. D. Chen, S. R. Manchester, H. Y. Sun // *American Journal of Botany*, 1999. – Vol. 86, № 8. – P. 1168–1181.
36. Гупал, А. М., Гупал Н. А. Причины симметрии в ДНК / А. М. Гупал, Н. А. Гупал // *Компьютерная математика*, 2017. – № 2. – С. 85–91.

P. S. Kiryanov, O. Yu. Baranov

STRUCTURAL ORGANIZATION OF THE 18S AND 28S RIBOSOMAL RNA GENES OF CURLY BIRCH

State Scientific Institution “Institute of Forest of the National Academy of Sciences of Belarus”
71, Proletarskaya St., 246050 Gomel, the Republic of Belarus
e-mail: PKirjanov@yandex.ru

The article demonstrates the results of sequencing of the 18S and 28S ribosomal RNA genes of curly birch and their transcripts. It is shown that their organization and primary structure are similar to Betulaceae. A comparative analysis of multiple reads made it possible to identify nucleotide polymorphism among gene copies within the individual curly birch tree. In a comparative analysis of the primary structures of *Betula pendula* var. *carelica* and *Arabidopsis thaliana* 18S and 28S ribosomal RNA genes, the features of nucleotide differences between taxa were characterized.

Keywords: ribosomal RNA genes, next-generation sequencing, curly birch, single-nucleotide polymorphism.

Дата поступления статьи: 11 мая 2020 г.

Г. В. Мозгова, А. Н. Островская, В. А. Лемеш, В. С. Остапчик, Н. И. Дробот

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ЦИФРОВОЙ КАПЕЛЬНОЙ ПЦР ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ И АБСОЛЮТНОГО КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГМ-ЛИНИЙ РАСТЕНИЙ

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

Капельная цифровая ПЦР (Droplet Digital PCR, ddPCR), разработанная для высокоточного абсолютного количественного анализа целевых последовательностей нуклеиновых кислот, находит широкое применение в научных исследованиях, клинической диагностике и оценке безопасности продуктов питания и кормов. Метод имеет ряд преимуществ по сравнению с распространенным методом количественной ПЦР в режиме реального времени (qRT-PCR): возможность проведения абсолютного количественного определения числа копий идентифицируемого фрагмента ДНК или РНК по конечной точке реакции амплификации, устойчивость к ингибиторам полимеризации, независимость результата анализа от эффективности ПЦР, отсутствие необходимости построения стандартных кривых, использования внешних калибраторов и внутренних контролей. В статье представлены результаты применения метода ddPCR в формате дуплекс-ПЦР для одновременной детекции и абсолютного количественного определения целевых последовательностей ДНК ГМ-линий сои A2704-12, FG72, MON87701, MON89788, BPS CV127-9, GTS 40-3-2 (трансген) и гена *Le1* (эндоген). Показана воспроизводимость методики для детекции и точного количественного определения ГМ-линий сои при разных разведениях и вне зависимости от числа повторов.

Ключевые слова: полимеразная цепная реакция (ПЦР), капельная цифровая ПЦР, ПЦР в режиме реального времени, ГМО, ГМ-линии, абсолютный количественный анализ.

Введение

Использование метода капельной цифровой ПЦР (Droplet Digital PCR, ddPCR) приобретает все большее значение в лабораторной диагностике. Метод ddPCR позволяет с высокой точностью и воспроизводимостью определять число копий амплифицируемых фрагментов ДНК или РНК и их концентрацию в каждом образце без необходимости построения стандартных кривых, что определяет перспективность его применения для геномных измерений, например, определения вариации числа копий гена (copy number variation, CNV) [1, 2]. Метод применяется также в тех областях молекулярной диагностики, когда необходимо точно определить ДНК или РНК-мишени, присутствующие в образце в очень низкой концентрации [3, 4], для валидации и количественной оценки библиотек NGS (next generation sequencing) [5] и транскриптомных исследований [6, 7]. Цифровую капельную

ПЦР начинают активно использовать для прикладных исследований: в онкодиагностике для количественной оценки трудно диагностируемых мутаций, в вирусологии и микробиологии для точной количественной оценки вирусной и бактериальной нагрузки, определения титра патогена [8–11]. Показана высокая эффективность метода для осуществления абсолютного количественного определения генно-модифицированных линий растений (ГМ-линий), в том числе для проведения скрининга продукции сложного состава и выявления спектра разрешенных и неразрешенных ГМ-линий (не одобренных для использования уполномоченным органом в стране) с различной концентрацией трансгена в образце [4].

Ряд стран мира и объединений государств, таких как Евразийский Экономический Союз (ЕАЭС) и Европейский Союз (ЕС), установили пороговые значения содержания ГМ-линий, при превышении которых продукция

должна маркироваться, при этом пороговые значения для маркировки в некоторых странах относительно низкие. Например, в ЕС определено, что необходимо маркировать пищевые продукты, которые содержат разрешенные ГМ-линии, в случае если процентное содержание ГМ-линий в продукции составляет 0,9% и выше [12]. Для кормов, в состав которых входят неразрешенные ГМ-линии и ГМ-линии, авторизация которых соответствующими компетентными органами находится на стадии одобрения либо истекла, порог составляет 0,1% [13].

По законодательству Республики Беларусь и ЕАЭС маркировка генно-модифицированных организмов (ГМО) и продуктов питания, полученных из ГМО, проводится при условии, если содержание ГМ-компонентов составляет 0,9% и выше [19]. На территории Республики Беларусь утвержден список разрешенных ГМ-линий сои и кукурузы, содержание которых в кормах допускается свыше 0,9% [14]. При этом Решением Комиссии Таможенного Союза от 18 июня 2010 г. № 317 [15] определено, что корма, произведенные без использования ГМ-компонентов, могут содержать незарегистрированных ГМ-линий 0,5% и менее и (или) зарегистрированных ГМ-линий 0,9% и менее каждого ГМ-компонента, а корма, произведенные с использованием ГМ-компонентов, могут содержать незарегистрированных ГМ-линий 0,5% и менее каждого ГМ-компонента. Таким образом, использование не зарегистрированных уполномоченными органами (не разрешенных) ГМ-линий для производства кормов, в случае если их содержание составляет 0,5% и выше, запрещено.

На мировом рынке ежегодно происходит увеличение разрешенных для использования в пищевых и кормовых целях ГМ-линий различных видов растений. На 2019 г. их количество по данным Международной службы по сбору агробиотехнологических заявок составило 505 ГМ-линий [16]. Отличающиеся подходы стран к маркировке продукции и различия по ГМ-линиям, одобренным для реализации в разных странах мира и содружествах государств, определяют необходимость разработки и применения в лабораториях детекции ГМО сложных систем скрининга, адаптированных для эффективного выявления как можно большего количества разрешенных

ГМ-линий в ходе одного анализа, а также для точного обнаружения неразрешенных ГМ-линий, концентрация которых в образце, как правило, низкая [17]. В связи с необходимостью детекции низких концентраций ДНК-мишеней, методы идентификации ГМ-линий должны соответствовать целому ряду требований, включая точность, воспроизводимость и повторяемость [4].

Для решения вышеуказанных задач активно ведутся работы по усовершенствованию методологии качественного и количественного анализа ДНК-мишеней в исследуемых образцах с использованием нового высокоточного метода — ddPCR [13]. Эффективность применения метода для количественного определения ГМ-линий в сложных многокомпонентных образцах, таких как продукты питания и корма, обусловлена тем, что по сравнению с традиционной количественной ПЦР (qRT-PCR) ddPCR обеспечивает абсолютный подсчет числа копий ДНК-мишени напрямую без использования промежуточных измерений, например, определения порогового значения цикла (Ct), без необходимости построения стандартной кривой, использования внешних калибраторов или внутренних контролей, при этом возможность смещения метода минимизирована [4, 18]. Увеличение соотношения «сигнал-шум» существенно упрощает определение редких целевых последовательностей за счет снижения степени конкуренции с многокопийными молекулами-матрицами [18]. Другими преимуществами новой методики является то, что оценка количества ДНК осуществляется по конечной точке реакции амплификации, что делает её устойчивой к ингибиторам полимеризации, а результат анализа не зависит от эффективности ПЦР [8, 19]. Цифровая капельная ПЦР способна обнаруживать ГМ-линию и провести количественную оценку трансгена с низкой концентрацией в образце, что снижает ошибку эксперимента [11, 18–20].

Цель данной работы — оптимизация и отработка методики цифровой капельной ПЦР в формате симплекс и дуплекс-ПЦР для идентификации разрешенных к реализации ГМ-линий сои на территории Республики Беларусь и ЕАЭС и сравнение метода ddPCR и qRT-PCR. Исследования проводились на ли-

ниях сои, содержание которых в кормах может превышать 0,9%. Точное количественное определение данных линий важно, поскольку в случае выявления содержания каждой из них в продукции ниже 0,9% считается, что это случайная или технически неустраняемая примесь и такая продукция не относится к ГМО и не маркируется [15, 21].

Материалы и методы

В работе использованы референсные материалы пяти ГМ линий сои A2704-12, FG72, MON87701, MON89788, BPS CV 127-9 (AOSC, США), стандарт коммерческого набора GTS 40-3-2, а также образцы соевого шрота и бобов различных производителей, содержащих ГМ-линию GTS 40-3-2 и проанализированные в Национальном координационном центре биобезопасности (НКЦБ) методом qRT-PCR.

Принцип используемого в работе метода относительно прост и основан на амплификации ДНК-мишеней в образце в сотнях, тысячах или даже миллионах сгенерированных капель, в каждой из которых проходит отдельная реакция амплификации [22]. Как правило, объем исследуемого образца разделяется с помощью водно-масляной эмульсии до 20 000 капель. ПЦР-амплификация, осуществляемая с помощью термоциклера, происходит независимо в каждой капле.

Система ddPCR QX200 (Bio-Rad, США), применяемая в Институте генетики и цитологии НАН Беларуси, позволяет проводить ПЦР с использованием TaqMan-зондов либо работать с интеркалирующим красителем EvaGreen [18]. Для детекции ГМ-линий наиболее точным, чувствительным и воспроизводимым является метод с использованием TaqMan-зондов [20, 23] — синтетических олигонуклеотидных зондов, несущих на 5'-конце флуорофор, а на 3'-конце — органическую молекулу, которая способна гасить флуоресценцию молекулы флуорофора.

В ходе постановки реакции цифровой капельной ПЦР можно выделить несколько этапов. Для генерации микрокапель ДНК исследуемого образца, TaqMan-зонд, праймеры и буфер для ПЦР вносят в ячейки 8-канального картриджа. Соответствующие ячейки картриджа заполняют минеральным маслом. Картридж помещают в генератор микроди-

сперсных капель, где образцы и масло соединяются при одновременном пропускании их через микроканалы. В результате формируется эмульсия, которая представляет собой взвесь монодисперсных капель объемом до 1 нл, содержащих ДНК-мишень. Полученную эмульсию переносят в 96-луночный планшет для проведения реакции ПЦР по заданной программе амплификации [18].

Для детекции результатов амплификации планшет помещают в автоматизированное устройство для считывания и подсчета капель (ридер капель) [18]. При прохождении через капилляр ридера, микрокапли разделяются и затем со скоростью ~1500 капель/сек последовательно проходят между источником возбуждающего света и детектором, регистрирующим уровень флуоресценции каждой микрокапли. Ридер капель по отдельности анализирует каждую каплю по каналам FAM и HEX (VIC). Положительные капли, содержащие как минимум одну копию ДНК-мишени, показывают повышенную флуоресценцию по сравнению с отрицательными каплями, при этом программное обеспечение вычисляет количество положительных и отрицательных капель для каждого флуорофора в каждом образце.

Поскольку случайное распределение молекул ДНК по микрокаплям приводит к тому, что ДНК либо отсутствует в микрокапле, либо присутствует в средней концентрации 1 молекула на микрокаплю, оценка числа копий ДНК-мишени основывается на биномиальном распределении Пуассона [18, 19]. После амплификации исходное количество молекул ДНК в пробе рассчитывают по соотношению микрокапель с положительным и отрицательным результатом реакции, что делает возможным прямое определение абсолютного количества молекул ДНК в образце [19].

Для экстракции ДНК из исходного материала использовали коммерческий набор «Реагенты для очистки ДНК «АртДНК» ООО АртБиоТех (Республика Беларусь).

Для детекции ГМ-линий использовали праймеры и зонды из работы [17], синтезированные ОДО «Праймтех» (Республика Беларусь).

Генерация капель осуществлялась в генераторе микродисперсионных капель QX200 (Bio-Rad, США) по инструкции производителя [18].

Для генерации капель использовали: 20 мкл ПЦР-смеси, содержащей 10 мкл 2х PCR мастер-микс Mix for probe (Bio-Rad, США), 3 рМ каждого праймера, 3рМ зонда, 20 нг тотальной ДНК и 70 мкл масла для генератора капель (Bio-Rad, США).

ПЦР проходила в термоциклере CFX 96 (Bio-Rad, США) в 40 мкл реакционной смеси, отобранной после генерации капель. Условия симплекс-ПЦР для детекции целевых последовательностей ДНК ГМ-линий: 95 °С 10 мин; 40 циклов: 95 °С, 15 с; 53 °С 45 с; 72 °С 20 с; 98 °С 10 с; 12 °С ∞; и «гена домашнего хозяйства» (эндоген): 95 °С 10 мин; 40 циклов: 95 °С 15 с; 62 °С 45 с; 72 °С 20 с; 98 °С 10 с; 12 °С ∞. Для ПЦР в формате дуплекс (одновременная детекция целевой последовательности ДНК ГМ-линии и эндогена) опытным путем подобраны следующие условия амплификации: 95 °С 10 мин; 40 циклов: 95 °С 15 с; 60 °С 60 с; 98 °С 10 мин; 12 °С ∞. В качестве эндогена служил ген *Le1*, кодирующий белок лектин.

Детекция ГМ-линий и эндогена проходила в двух параллельных измерениях, в двух повторностях каждое.

Анализ результатов проводился с использованием оборудования QX200 Droplet Reader (Bio-Rad, США) согласно инструкции [18]. Ридер капель по отдельности анализировал каждую каплю с помощью двухцветной системы определения (красители FAM и HEX).

Результаты и обсуждение

Для отработки методики ddPCR использован формат симплекс-ПЦР. В качестве эндогена, экспрессирующегося практически во всех тканях и клетках определенного вида растения на относительно постоянном уровне, по отношению к которому проводится расчет массовой доли ГМ-линий, использован ген *Le1*, кодирующий белок лектин. Данный ген был валидирован в качестве эндогена для проведения qRT-PCR и ddPCR у сои *Glycine max* (L.) Merr. [4]. Для детекции целевой последовательности каждой ГМ-линии сои (GTS 40-3-2, A2704-12, FG72, MON87701, MON89788, BPS CV 127-9) и эндогена нами проведено по 2 эксперимента в двух повторностях.

После подтверждения успешной амплификации и выявления целевых последова-

тельностей всех исследуемых ГМ-линий и нуклеотидной последовательности эндогена в формате симплекс-ПЦР, с использованием 1х разведения ДНК была проведена оптимизация методики детекции и количественного определения в формате дуплекс-ПЦР (одновременное выявление трансгена и эндогена в одной пробирке). Исследования проводились с использованием референсного материала, содержащего следующие ГМ-линии сои: A2704-12, FG72, MON87701, MON89788 и BPS CV 127-9 (B-F на рис. 1 соответственно), а также ГМ-образца соевых бобов (А на рис. 1) и стандарта коммерческого набора (Н на рис. 1), в которых ранее в НКЦБ методом qRT-PCR было подтверждено наличие ГМ-линии GTS 40-3-2.

Результаты анализа ddPCR представляются в виде 1D графика, на котором показана интенсивности сигнала флуоресценции (ось Y) каждой капли образца (рис. 1). Все капли, расположенные выше пороговой линии, оценивались как положительные, а ниже пороговой линии — как отрицательные.

Данные ddPCR, полученные в результате эксперимента в формате дуплекс-ПЦР с двумя ДНК-мишенями (трансген и эндоген), также можно просмотреть в виде двухмерного графика (2D), на котором интенсивность сигнала флуоресценции в канале 1 (FAM) — ось Y, сравнивается с интенсивностью сигнала флуоресценции в канале 2 (HEX или VIC) — ось X (рис. 2).

Распределение ДНК по каплям происходит случайно; капли объединяются в четыре группы:

- FAM-отрицательные, HEX-отрицательные (не содержат ГМ-линию и эндоген);
- FAM-положительные, HEX-отрицательные (содержат ГМ-линию, не содержат эндоген);
- FAM-отрицательные, HEX-положительные (не содержат ГМ-линию, содержат эндоген);
- FAM-положительные, HEX-положительные (содержат ГМ-линию и эндоген).

В результате анализа было установлено наличие пяти ГМ-линий в соответствующем референсном материале: A2704-12, FG72, MON87701, MON89788, BPS CV127-9 (B-F на рис. 1 соответственно). Подтверждено наличие ГМ-линии GTS 40-3-2 в ГМ-образце соевых бобов, в котором ранее методом

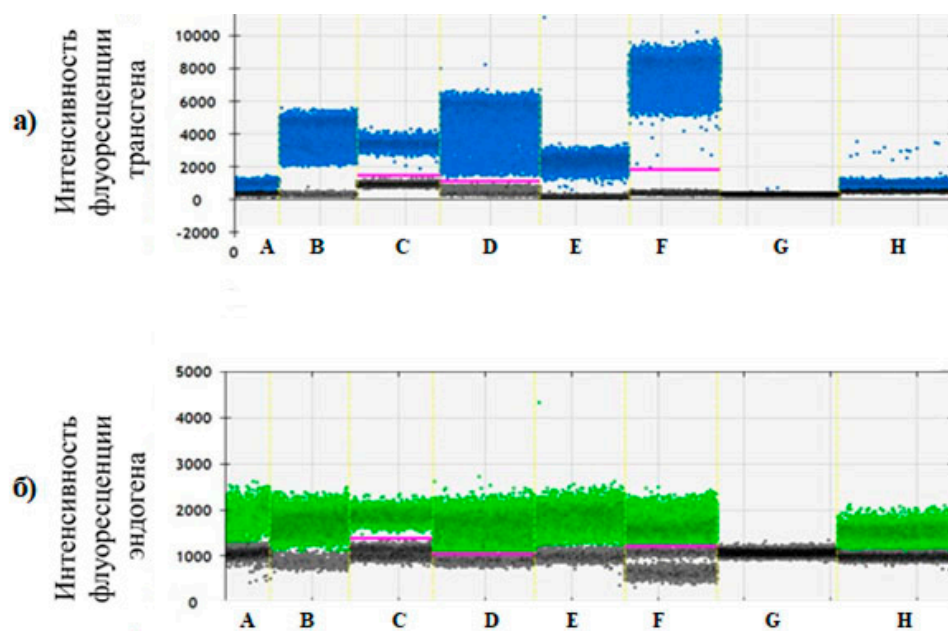


Рис. 1. 1D график представления результатов детекции целевых последовательностей ГМ-линий сои и последовательности *Le1* эндогена методом ddPCR

A — ГМ-образец соевых бобов, содержащий ГМ-линию GTS 40-3-2; B — референсный материал ГМ- линии A2704-12; C — референсный материал ГМ-линии FG72; D — референсный материал ГМ-линии MON87701; E — референсный материал ГМ-линии MON89788; F — референсный материал ГМ-линии BPS CV127-9; G — отрицательный контроль; H — стандарт коммерческого набора ГМ-линии GTS 40-3-2

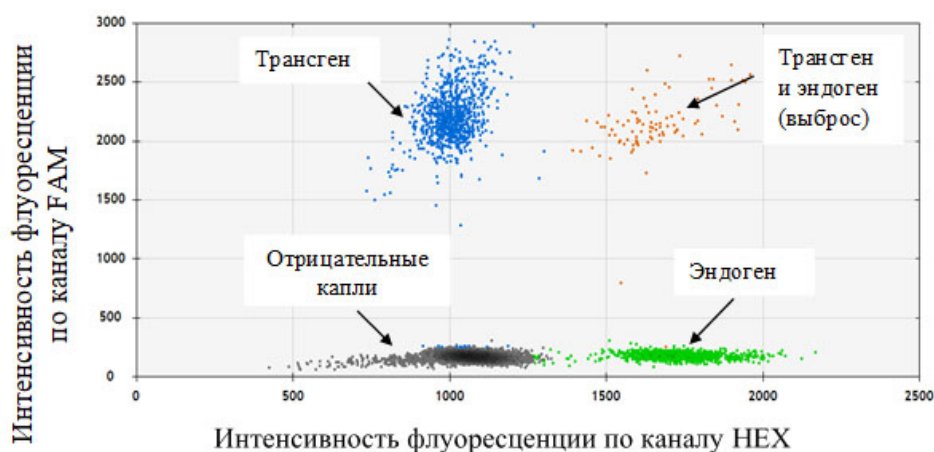


Рис. 2. 2D график представления результатов детекции целевой последовательности ГМ-линии сои GTS 40-3-2 (трансген) и последовательности *Le1* (эндоген) методом ddPCR (1x разведение)

qRT-PCR была выявлена данная линия (рис. 1, A). ГМ-линия GTS 40-3-2 также детектировалась в стандарте коммерческого набора (рис. 1, H).

В стандартных экспериментах с использованием ddPCR образец случайным образом разделяется на отдельные капли, поэтому одни капли не содержат молекулы-матрицы нуклеиновых кислот, а другие содержат одну или несколько копий. Программное обе-

спечение QuantaSoft™ измеряет количество положительных и отрицательных капель для каждого флуорофора в образце и присваивает каждой положительной капле значение «1», а каждой отрицательной капле — значение «0» [18]. В формуле, используемой программным обеспечением для расчета начальной концентрации целевой последовательности ДНК ГМ-линии или нуклеотидной последовательности эндогена на каплю, применяется

алгоритм вычисления функции распределения Пуассона.

Формула для расчета концентрации C (копий/мкл) [18]:

$$C = -\ln(N_{\text{отр}}/N)/V_{\text{капли}}, \text{ где}$$

$N_{\text{отр}}$ — количество отрицательных капель,

N — общее количество капель,

$V_{\text{капли}}$ — объем капли.

Далее нами был произведен пересчет концентрации целевой последовательности ДНК каждой ГМ-линии и нуклеотидной последовательности эндогена на образец. Массовую долю ГМ-линии в образце определили как соотношение концентрации целевой последовательности ДНК ГМ-линии к эндогену и выразили в %.

На рисунке 3 представлено соотношение рассчитанных концентраций трансгена (целевой последовательности ДНК) каждой ГМ-линии и последовательности эндогена (копий/мкл). На основании полученных результатов проведен расчет массовой доли ГМ-линий в образце (%) (табл.). Было установлено, что определенное нами процентное содержание ГМ-линий сои GTS 40-3-2, A2704-12, FG72, MON87701, MON89788, BPS CV 127-9 в референсных материалах соответствует содержанию, заявленному в сертификатах качества. Содержание ГМ-линии GTS 40-3-2 в стандарте коммерческого на-

бора (Н), определенное методом ddPCR, составило 40,4%, что говорит о более высокой чувствительности метода по сравнению с qRT-PCR, поскольку массовая доля ГМ-линии GTS 40-3-2, выявленная последним методом, составила 37,9%. Установлено, что массовая доля ГМ-линии GTS 40-3-2 в образце соевых бобов составила 92,2%.

Кроме того, методом ddPCR было выявлено, что число копий ГМ-линии MON89788 составило 420. Поскольку в исследовании был использован референсный материал с известным числом копий, определенных методом qRT-PCR (400 копий), то можно утверждать, что полученные нами результаты говорят о более высокой чувствительности ddPCR по сравнению с qRT-PCR.

Детекция 3-х ГМ-линий сои MON89788, MON87701 и FG72 методом ddPCR в двукратной повторности при 10х и 100х разведениях (рис. 4–6) показала воспроизводимость данных по сравнению с 1х разведением (табл.). Так, для ГМ-линии сои MON89788 была определена средняя массовая доля (при 10х и 100х разведениях) — 81,2%, что сопоставимо с результатом, полученным для 1х разведения — 88,0%. Процентное содержание ГМ-линий сои MON 87701 и FG72 составило 91,2% и 98,0% соответственно, что подтверждает полученные результаты 1х разведения (табл.).

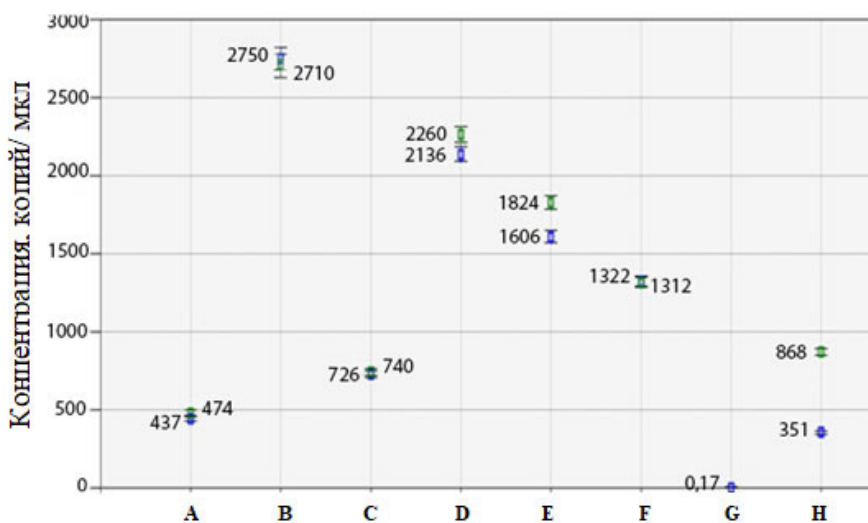


Рис. 3. Соотношение концентраций трансген/эндоген (копий/мкл)

A — ГМ-образец соевых бобов, содержащий ГМ-линию GTS 40-3-2; B — референсный материал ГМ-линии A2704-12; C — референсный материал ГМ-линии FG72; D — референсный материал ГМ-линии MON87701; E — референсный материал ГМ-линии MON89788; F — референсный материал ГМ-линии BPS CV127-9; G — отрицательный контроль; H — стандарт коммерческого набора ГМ-линии GTS 40-3-2

Проведенный нами анализ образца соевого шрота методом ddPCR, в котором ранее нами была выявлена ГМ-линия GTS 40-3-2 методом qRT-PCR, подтвердил наличие этой ГМ-линии. ddPCR показал сопоставимые результаты в повторях при 1х, 10х и 100х разведениях (рис. 7). Рассчитанная массовая доля ГМ-линии GTS 40-3-2 в образце составила 22,82% от общего содержания сои.

Таким образом, проведенный абсолютный количественный расчет содержания ГМ-линий сои GTS 40-3-2, MON87701, MON89788 показал воспроизводимость метода дуплексной ddPCR и повторяемость результатов измерений анализируемых проб при разных разведениях (1х, 10 х, 100х), а также уменьшение числа копий трансгена и эндогена, кратное разбавлению.

Таблица

Массовая доля ГМ-линий, выявленная с помощью цифровой капельной ПЦР (1х разведение)

№*	ГМ-линия	ГМО, %	
A	GTS 40-3-2 (образец)	92,2	
B	A2704-12	98,5	
C	FG72	98,1	
D	MON 87701	94,5	
E	MON 89788	88,0	
F	BSP CV 127-9	99,2	
H	GTS 40-3-2	40,4	37,9 (qRT-PCR)

Примечание. * — порядковый номер лунки на рисунке 1

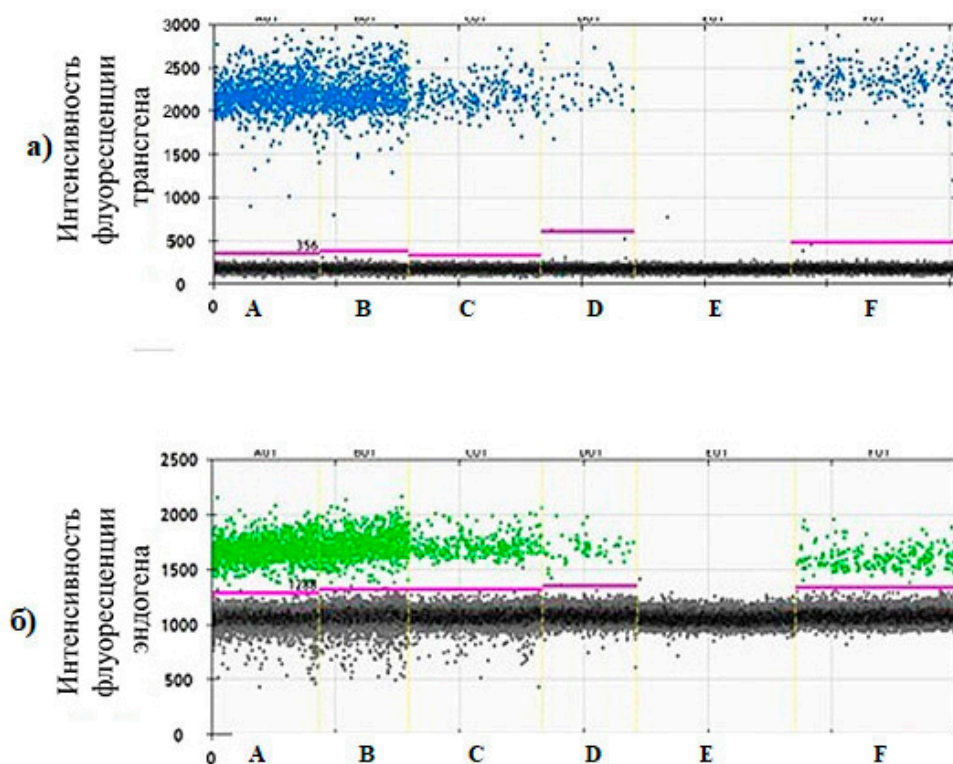


Рис. 4. 1D график представления результатов детекции целевых последовательностей ГМ-линии сои MON 89788 и последовательности *Le1* эндогена

A, B — 10х разведение; C, D — 100х разведение; E — отрицательный контроль; F — положительный контроль

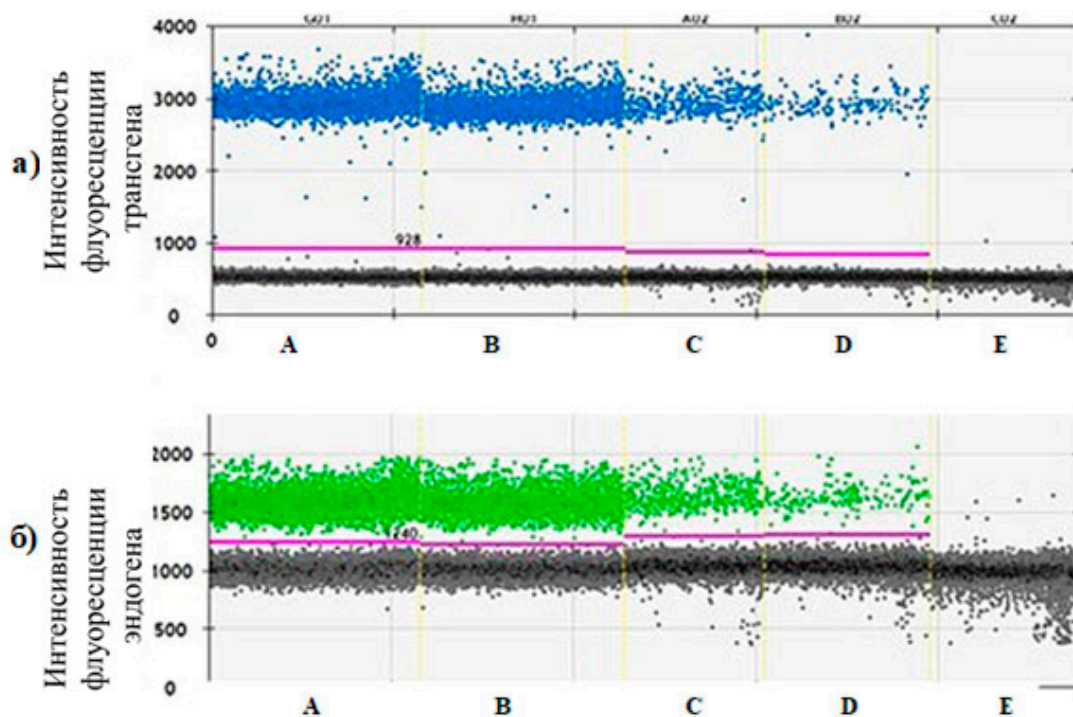


Рис. 5. 1D график представления результатов детекции целевых последовательностей ГМ-линии сои MON 87701 и последовательности *LeI* эндогена
A, B — 10x разведение; C, D — 100x разведение; E — отрицательный контроль

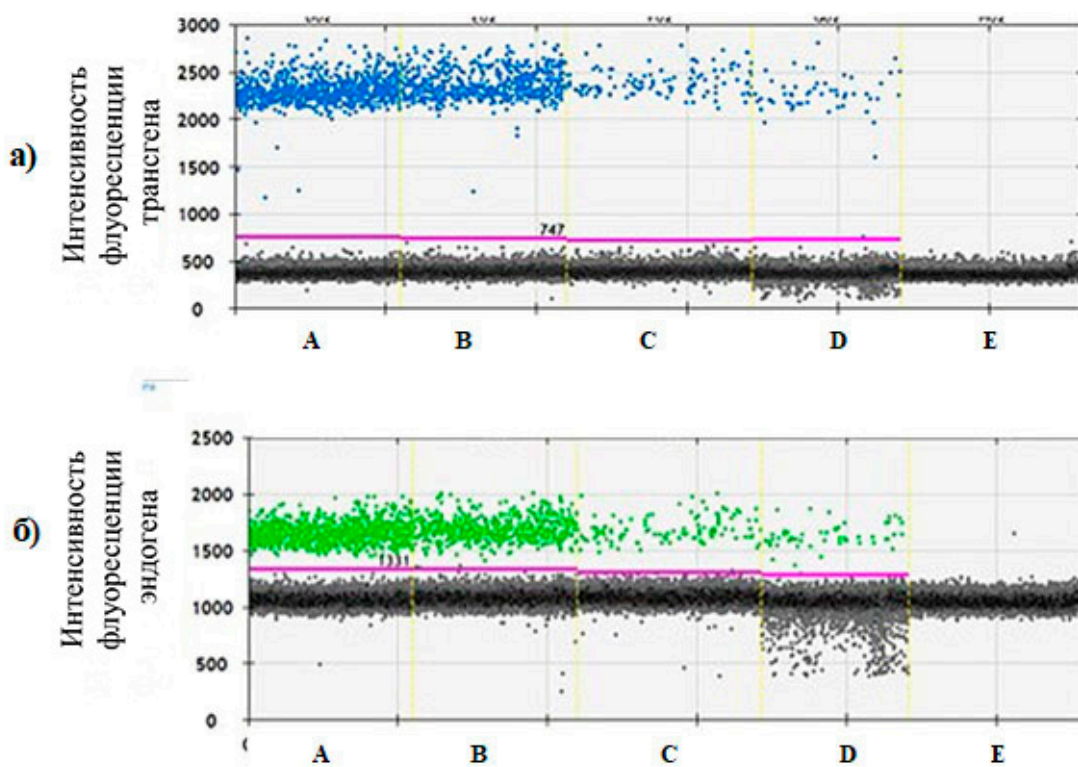


Рис. 6. 1D график представления результатов детекции целевых последовательностей ГМ-линии сои FG72 и последовательности *LeI* эндогена
A, B — 10x разведение; C, D — 100x разведение; E — отрицательный контроль

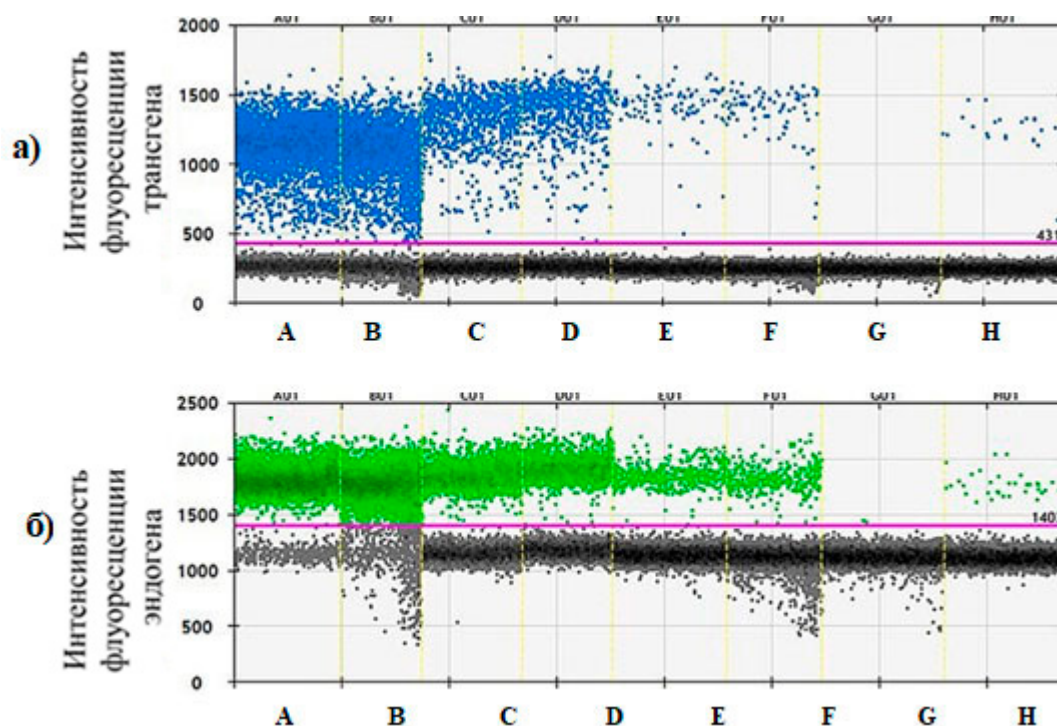


Рис. 7. 1D график представления результатов детекции целевых последовательностей ГМ-линии сои GTS 40-3-2 и последовательности *Le1* эндогена в образце соевого шрота при 1x, 10x и 100x разведениях A, B — 1x разведение; C, D — 10x разведение; E, F — 100x разведение; G — отрицательный контроль; H — положительный контроль линии GTS 40-3-2

Результаты работы подтверждают исследования [4, 17, 23], в которых показано, что с помощью ddPCR можно обнаружить и провести количественную оценку ГМ-линий при больших разведениях и с низким числом копий ДНК-мишени в образце, что крайне важно с точки зрения маркировки продукции, содержащей как разрешенные (прошедшие оценку рисков и допущенные для использования при производстве продуктов питания и кормов), так и не разрешенные к реализации ГМ-линии. В техническом нормативно-правовом акте (ТНПА) Республики Беларусь СанПиН «Требования к продовольственному сырью и пищевым продуктам», Гигиенический норматив «Показатели безопасности и безвредности для человека продовольственного сырья и пищевых продуктов» от 21.06.2013 № 52 определено, что «в случае, если изготовитель при производстве пищевой продукции не использовал генномодифицированные организмы, содержание в пищевой продукции 0,9% и менее ГМО является случайной или технически неустраняемой примесью, и такая пищевая продукция не относится к пищевой продукции, содержащей

ГМО. При маркировке такой продукции сведения о наличии ГМО не указываются» [21]. Вместе с тем, данным ТНПА определено, что использование продовольственного сырья, содержащего ГМО и (или) компоненты из ГМО, для производства пищевой продукции для беременных и кормящих женщин, пищевой продукции для детского питания не допускается. В Приложении 2 к «Ветеринарно-санитарным правилам обеспечения безопасности в ветеринарно-санитарном отношении кормов и кормовых добавок» определены ГМ-линии сои и кукурузы, содержание которых в кормах допускается свыше 0,9%. При этом, решением Комиссии Таможенного Союза от 18 июня 2010 г. № 317 [15] определено, что корма, произведенные без использования ГМ-компонентов, могут содержать незарегистрированных линий 0,5% и менее и (или) зарегистрированных линий 0,9% и менее каждого ГМ-компонента, а корма, произведенные с использованием ГМ-компонентов, могут содержать незарегистрированных линий 0,5% и менее каждого ГМ-компонента. Таким образом, массовая доля ГМО в пищевой

продукции, предназначенной для употребления беременными, кормящими женщинами и для детского питания, должна составлять 0%. Использование не зарегистрированных уполномоченными органами (не разрешенных) ГМ-линий для производства кормов, в случае, если их содержание составляет свыше 0,5%, запрещено. В этой связи метод ddPCR особенно актуален для детекции и точного абсолютного количественного установления низких уровней содержания ГМО в пищевой продукции для детского питания, беременных и кормящих женщин и для анализа зерна, используемого при производстве кормов.

Для того, чтобы достичь низкой затратности любой технологии, основанной на ПЦР, самым эффективным подходом является разработка стратегии мультиплексирования. Вместе с тем, мультиплексирование qRT-PCR для точного количественного определения разрешенных и неразрешенных ГМ-линий имеет ряд ограничений [14], в связи с чем к настоящему времени были валидированы только две методики дуплекс qRT-PCR (одна в Европе, одна в Японии) [24]. Платформы, основанные на ddPCR, включают детекцию по двум флуоресцентным меткам и, следовательно, позволяют осуществить, как минимум, дуплекс-реакцию. Однако результаты последних работ показывают, что при оптимизации методики возможен более высокий уровень мультиплексирования и были получены достоверные данные мультиплекс-ПЦР по выявлению трех, четырех и даже одиннадцати ДНК-мишеней в одном анализе [17]. С целью разработки методики мультиплекс-ПЦР для проведения одновременного анализа разрешенных в Республике Беларусь ГМ-линий в настоящее время нами проводится подбор концентраций праймеров и зондов и оптимизация условий реакции амплификации для ddPCR.

Заключение

Цифровая капельная ПЦР (ddPCR) является усовершенствованным методом полимеразной цепной реакции и позволяет определять абсолютное количество ДНК-мишеней в исследуемых образцах за счет разделения реакционной смеси на множество капель и проведения реакции амплификации с последующей регистрацией сигнала отдельно в каждой капле. Данный метод по точности не уступает ПЦР в режиме

реального времени (qRT-PCR), при этом обладает рядом преимуществ, таких как устойчивость к ингибиторам полимеризации, независимость результата анализа от эффективности ПЦР, отсутствие необходимости построения стандартной кривой, использования внешних калибраторов и внутренних контролей, способность точно идентифицировать амплифицируемые последовательности, присутствующие в образце в низких концентрациях. Метод с высокой точностью и воспроизводимостью позволяет выявлять ГМ-линии и определять их концентрацию в сложных многокомпонентных образцах, таких как продукты питания и корма. В работе рассмотрен принцип метода ddPCR и подход к идентификации и определению абсолютного количества наиболее часто выявляемых на рынке Республики Беларусь разрешенных ГМ-линий сои.

Проведенные нами исследования позволили установить эффективность метода ddPCR в формате дуплекс-ПЦР для одновременной детекции трансгена (целевых последовательностей ДНК ГМ-линий сои A2704-12, FG72, MON87701, MON89788, BPS CV127-9, GTS 40-3-2) и эндогена (гена *Le1*) и абсолютного количественного обсчета их содержания. Показана повторяемость методики и ее воспроизводимость при разных разведениях для детекции и количественного определения разрешенных ГМ-линий сои.

Список использованных источников

1. Bell, A. D. Analyzing copy number variation with droplet digital PCR / A. D. Bell, C. L Usher, S. A. McCarroll // *Methods Mol. Biol.* – 2018. – № 1768. – P. 143–160.
2. Rapid screening of copy number variations in STRC by droplet digital PCR in patients with mild-to-moderate hearing loss / T. Ito [et al.] // *Hum. Genome Var.* – 2019. – № 41. – 6 p. doi: 10.1038/s41439-019-0075-5.
3. Development of a duplex droplet digital PCR assay for absolute quantitative detection of “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” // V. Selvaraj [et al.] // *Plos One.* – 2018. – Vol. 13, № 5. – 16 p. doi: 10.1371/journal.pone.0197184.
4. Digital PCR as an effective tool for GMO quantification in complex matrices / A. B. Košir [et al.] // *Food Chemistry.* – 2019. – Vol. 294, № 1. – P. 73–78.

5. Aigrain, L. Quantitation of next generation sequencing library preparation protocol efficiencies using droplet digital PCR assays - a systematic comparison of DNA library preparation kits for Illumina sequencing / L. Aigrain, Y. Gu, M. A. Quail // *BMC Genomics*. – 2016. – Vol. 17, № 458. – 11 p. doi: 10.1186/s12864-016-2757-4.
6. Transcriptome profiling of two maize inbreds with distinct responses to *Gibberella* ear rot disease to identify candidate resistance genes / A. Z. Kebede [et al.] // *BMC Genomics*. – 2018. – Vol. 19, № 131. – 12 p. doi: 10.1186/s12864-018-4513-4.
7. Podlesniy, P. Absolute measurement of gene transcripts with Selfie-digital PCR / P. Podlesniy, R. Trullas // *Sci. Reports*. – 2017. – Vol. 7, № 1. – 15 p. doi:10.1038/s41598-017-08270-w.
8. Droplet digital PCR for detection of BRAF V600E mutation in formalin-fixed, paraffin-embedded melanoma tissues: a comparison with Cobas® 4800, Sanger sequencing, and allele-specific PCR / B. Malicherova [et al.] // *Am J Transl Res*. – 2018. – Vol. 10, № 11. – P. 3773–3781.
9. Development and application of a droplet digital polymerase chain reaction (ddPCR) for detection and investigation of African swine fever virus / X. Wu [et al.] // *Can J Vet Res*. – 2018. – Vol. 82, № 1. – P. 70–74.
10. 16S rDNA droplet digital PCR for monitoring bacterial DNA in bloodstream infections / I. Ziegler [et al.] // *PLoS One*. – 2019. – Vol. 14, № 11. – 14 p. doi: 10.1371/journal.pone.0224656.
11. Application of droplet digital PCR for quantitative detection of *Spiroplasma citri* in comparison with real time PCR / Y. Maheshwari [et al.] // *PLoS ONE*. 2017 – Vol. 12, № 9. – 16 p. doi: 10.1371/journal.pone.0184751.
12. European Commission Regulation (EC) No. 1829/2003 of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003 on genetically modified food and feed: text with EEA relevance; 268:1–23. – Off J Eur Union. – 2003.
13. European Commission Regulation No. 619/2011 of 24 June 2011 laying down the methods of sampling and analysis for the official control of feed as regards presence of genetically modified material for which an authorization procedure is pending or the authorization of which has expired: text with EEA relevance; 166: 9–15. – Off J Eur Union. – 2011.
14. Приложение 2 к Ветеринарно-санитарным правилам обеспечения безопасности в ветеринарно-санитарном отношении кормов и кормовых добавок в редакции постановления Министерства сельского хозяйства и продовольствия Республики Беларусь от 5 февраля 2018 г. № 9. – Зарегистрировано в Национальном реестре правовых актов Республики Беларусь 06.02.2018 г. № 8/32801. – Веб-сайт НКЦБ [Электронный ресурс]. – Режим доступа: http://www.biosafety.by/wp-content/uploads/2019/01/razreshennye_linii.pdf. – Дата доступа: 02.01.2020.
15. Решение Комиссии Таможенного Союза 18 июня 2010 г. № 317 «О применении ветеринарно-санитарных мер в Евразийском Экономическом Союзе». – Консультант Плюс [Электронный ресурс], 2019. – 221 с.
16. База данных ГМО [Электронный ресурс]. – ISAAA, 2019. – Режим доступа: <http://www.isaaa.org/gmaprovaldatabase>. – Дата доступа: 02.01.2020.
17. Development and inter-laboratory assessment of droplet digital PCR assays for multiplex quantification of 15 genetically modified soybean lines / A. B. Košir [et al.] // *Sci. Report*. – 2017. – Vol. 7, Art. 8601. – 11 p. doi:10.1038/s41598-017-09377-w.
18. Руководство по эксплуатации Генератора капель QX200 [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.bio-rad.com/ru-ru/applications-technologies/planning-droplet-digital-pcr-experiments?ID=MDV33OKG4>. – Дата доступа: 02.04.2020.
19. Цифровая капельная ПЦР – перспективный технологический подход к количественному профилированию микро рРНК / Я. Ю. Киселева [и др.] / *Биомедицинская химия*. – 2015. – Т. 62, вып. 4. – С. 403–410.
20. Dobnik, D. Critical assessment of digital PCR for the detection and quantification of genetically modified organisms / D. Dobnik, T. Demeke // *Anal. Bioanal. Chem*. – 2018. – Vol. 410, № 17. – P. 4039–4050.
21. Постановление Министерства здравоохранения Республики Беларусь 21 июня 2013 г. № 52 Об утверждении санитарных норм и правил «Требования к продовольственному сырью и пищевым продуктам», гигиенического норматива «Показатели безопасности и безвредности для человека продо-

вольственного сырья и пищевых продуктов» и признании утратившими силу некоторых постановлений Министерства здравоохранения Республики Беларусь. – Зарегистрировано в Национальном реестре правовых актов Республики Беларусь 4 июля 2013 г. № 8/27668 – Консультант Плюс [Электронный ресурс], 2017. – 529 с.

22. Хьюгет, Д. Цифровая ПЦР как новая технология и ее потенциальный вклад в молекулярную диагностику / Д. Хьюгет, А. Вейл // Клиническая лабораторная диагностика. – 2014. – № 11. – С. 6–7.

23. Development and application of droplet digital PCR tools for the detection of transgenes in pastures and pasture-based products / P. A. Giraldo [et al.] // Front. Plant Sci. – 2019. – Vol. 9, Art. 1923. – 11 p. – Режим доступа: <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01923>. – Дата доступа: 02.04.2020.

24. Validation and collaborative study of a P35S and T-nos duplex real-time PCR screening method to detect genetically modified organisms in food products / H. Waiblinger [et al.] // Eur. Food Res. Technol. – 2008. – № 226. – P. 1221–1228.

G. V. Mozgova, A. N. Astrouskaya, V. A. Lemesh, V. S. Ostapchik, N. I. Drobot

USE OF DROPLET DIGITAL PCR FOR THE DETECTION AND ABSOLUTE QUANTIFICATION OF GMO LINES

State Scientific Institution

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

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

e-mail: G.Mozgova@igc.by

Droplet Digital PCR (ddPCR) developed for the high-precision absolute quantitative analysis of target nucleic acid sequences is widely used in scientific research, in the clinical diagnosis and analysis of food and feed safety. The technique has a number of advantages over the common method of quantitative real-time PCR (qRT-PCR). This includes the ability to conduct the absolute quantification of the number of copies of an identifiable DNA or RNA fragment by the endpoint of an amplification reaction, resistance to polymerization inhibitors, independence of an analysis result from the PCR efficiency. Also, there is no need to plot standard curves and use external calibrators and internal controls. The article presents the results of applying ddPCR in the duplex-PCR format for the simultaneous detection and absolute quantification of target DNA sequences of GM soybean lines A2704-12, FG72, MON87701, MON89788, BPS CV127-9, GTS 40-3-2 (transgene) and the *Le1* gene (endogene). The technique reproducibility in the detection and accurate quantification of GM soybean lines at different dilutions and regardless of the number of repeats is shown.

Keywords: polymerase chain reaction (PCR), Droplet Digital PCR, real-time PCR, GMO, GM lines, absolute quantitative analysis.

Дата поступления статьи: 9 апреля 2020 г.

О. М. Малышева¹, Е. П. Михаленко¹, М. В. Аргюшевская², А. П. Сухарева^{2,3}, К. А. Гомолко^{2,3},
А. В. Кильчевский¹, Г. А. Шишко²

ПОЛИМОРФИЗМЫ ГЕНОВ *MMP2* И *MMP9* У НЕДОНОШЕННЫХ НОВОРОЖДЕННЫХ С СИНДРОМОМ ДЫХАТЕЛЬНЫХ РАССТРОЙСТВ

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

²Государственное учреждение образования
«Белорусская медицинская академия последипломного образования»
Республика Беларусь, 220013, г. Минск, ул. П. Бровки, 3, корпус 3

³Учреждение здравоохранения «Клинический родильный дом Минской области»
Республика Беларусь, 220114, г. Минск, ул. Ф. Скорины, 16

Исследована частота встречаемости полиморфных вариантов -735 C>T rs2285053, -1575 G>A rs243866 гена *MMP2* и с.836A>G p.Gln279Arg rs17576, -1562 C>T rs3918242 гена *MMP9* у 188 недоношенных новорожденных в сроке гестации 28–36 недель с синдромом дыхательных расстройств (СДР) и 189 доношенных новорожденных (группа сравнения). Обнаружено статистически значимое увеличение частоты встречаемости гетерозиготного генотипа -735CT в группе недоношенных новорожденных с дыхательными нарушениями по сравнению с группой сравнения ($p = 0,033$) и у новорожденных с СДР тяжелой степени по сравнению с СДР умеренной степени тяжести ($p = 0,035$). Степень тяжести течения СДР у девочек ассоциировалась с аллелем -735T, а у мальчиков — с -1575G гена *MMP2*. Показано, что генотип 836GG rs17576 гена *MMP9* является рискованным в развитии СДР для девочек. Комбинации генотипов 836AA/-1562CC гена *MMP9* и -735CC/-1575A- гена *MMP2* достоверно чаще встречались у пациентов с СДР умеренной степени тяжести ($p = 0,038$ и $p = 0,019$ соответственно).

Ключевые слова: синдром дыхательных расстройств, бронхолегочная дисплазия, недоношенные новорожденные, матриксные металлопротеиназы, полиморфизмы генов *MMP2* и *MMP9*.

Введение

За период 2017–2019 гг. согласно отчетам об оказании медицинской помощи беременным, роженицам и родильницам в Республике Беларусь удельный вес преждевременных родов составил около 4%. Недоношенные новорожденные из-за незрелости органов и систем испытывают проблемы с дыханием, питанием, зрением, слухом, имеют неврологические расстройства, задержку развития. Риск смерти в периоде новорожденности у недоношенных детей в 20 раз превышает этот показатель у детей, родившихся в срок [1–3]. Поэтому проблема недоношенности остается актуальной для нашей страны.

Наиболее частым нарушением со стороны дыхательной системы у недоношенных новорожденных является синдром дыха-

тельных расстройств, который развивается из-за недостатка сурфактанта и незрелости легких и является наиболее частой причиной формирования хронической патологии дыхательной системы, а также смерти новорожденного [4–6].

Легкие недоношенного новорожденного, родившегося в сроке гестации 28–36 недель, проходят саккулярную и альвеолярную стадии развития. В этот период образуются альвеолярные протоки, альвеолы (путем септации альвеолярных саккул) и сеть капилляров, окружающая альвеолы, увеличивается газообменная поверхность и синтезируется сурфактант (с 26 недели гестации) [7]. Ключевую роль в ремоделировании внеклеточного матрикса, происходящем при альвеоляризации и ангиогенезе, играют матриксные

металлопротеиназы (ММП), цинк-зависимые протеолитические ферменты, расщепляющие все формы компонентов матрикса. ММП оказывают регуляторное влияние на ангиогенез в легком, высвобождая из внеклеточного матрикса фактор роста фибробластов (FGF) и фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), которые, в свою очередь, способны увеличивать экспрессию металлопротеиназ, важных для развития сосудов. В образовании альвеолярных протоков и альвеол принимают участие ММП-14 и ММП-2. Дефицит ММП-2 приводит к отсроченной альвеоляризации в ассоциации с утолщенными легочными артериями и повышенным периваскулярным содержанием коллагена и эластина. Во время альвеоляризации увеличивается экспрессия ММП-9, источником которой являются клетки бронхиального эпителия, макрофаги и альвеолоциты II типа [7–9].

Полиморфизмы в генах *MMP2* и *MMP9* могут модифицировать их экспрессию, влиять на функцию активных ферментов и изменять их роль как в физиологическом ангиогенезе и альвеоляризации, так и в патогенезе респираторных нарушений.

Цель данного исследования — изучить связь полиморфных вариантов генов *MMP2*

и *MMP9* с тяжестью синдрома дыхательных расстройств у недоношенных новорожденных, а также их распределение в основной группе и в группе сравнения (здоровые доношенные новорожденные).

Материалы и методы

В исследование включен 377 образец ДНК детей, родившихся в УЗ «Клинический родильный дом Минской области» в 2016–2020 гг.

Распределение пациентов по группам, а также критерии включения пациентов в исследуемые группы показано на рисунке 1.

Соотношение мальчиков и девочек было одинаковым в подгруппах с умеренной и тяжелой формами СДР. В подгруппе СДР умеренной степени преобладали новорожденные со сроком гестации 32–36 недель (57,1%), а в подгруппе СДР тяжелой степени — новорожденные 28–32 недели (81,1%) ($p < 0,001$).

Критерии исключения пациентов из исследования: многоплодная беременность, наследственные и врожденные заболевания, ВИЧ-инфекция у матери, инфекционные болезни, специфичные для перинатального периода.

Сбор биологического материала проводился с соблюдением этических норм (добро-

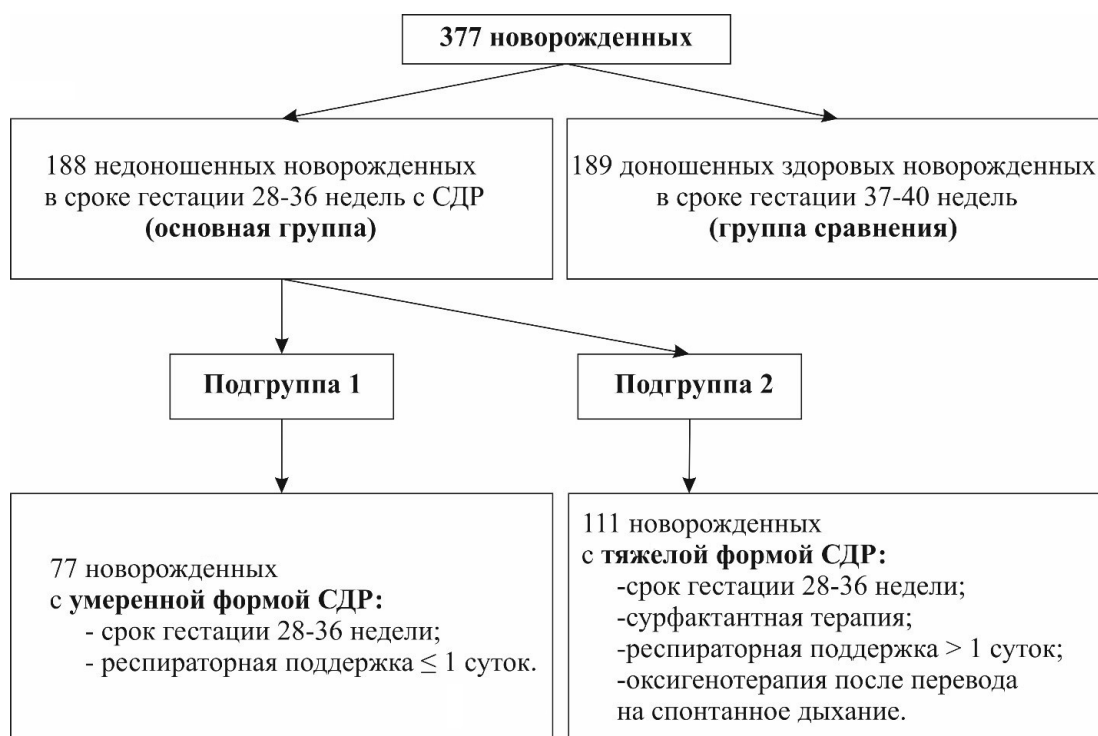


Рис. 1. Распределение пациентов и критерии их включения в исследуемые группы

вольность, конфиденциальность) с письменного информированного согласия законного представителя пациента. Получено разрешение Комитета по этике БелМАПО на проведение исследования.

Геномную ДНК выделяли из лейкоцитов пуповинной и периферической венозной крови методом фенольно-хлороформной экстракции с использованием протеиназы К с последующей очисткой этанолом [10]. Для выявления полиморфизмов -735 C>T (rs2285053), -1575 G>A (rs243866) гена *MMP2* и с.836A>G p.Gln279Arg (rs17576), -1562 C>T (rs3918242) гена *MMP9* использовали метод ПЦР с последующим анализом длин рестрикционных фрагментов (ПЦР-ПДРФ). В таблице 1 представлены праймеры и эндонуклеазы рестрикции, использованные в работе [11–15].

Условия ПЦР подбирали экспериментально для каждой пары праймеров. Амплифицированные фрагменты исследуемых генов подвергали рестрикционному расщеплению соответствующей эндонуклеазой согласно инструкции фирмы-производителя. Продукты рестрикции фракционировали в горизонтальном агарозном геле с концентрацией 1,8–2,2% в зависимости от длины ПДРФ-фрагментов.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием онлайн-ресурса SNPStats [16] и прикладной программы GraphPad InStat Version 3.05. Тест на соответствие контрольной выборки (группа сравнения) равновесию Харди-Вайнберга проводили с использованием метода χ^2 ($\alpha = 0,05$; $df = 1$).

Связь между генотипами, гаплотипами и течением заболевания оценивали по отношению шансов (OR (95% CI)) с использованием кодоминантной модели SNPStats. OR указан с 95%-ным доверительным интервалом (confidence interval — CI) [16]. Значение p менее 0,05 считалось статистически значимым. Когда объем выборки не превышал 5 случаев, использовали точный тест Фишера.

Результаты и обсуждение

Распределение частот полиморфных вариантов исследуемых локусов у новорожденных группы сравнения соответствовало равновесию Харди-Вайнберга.

Поиск ассоциаций между исследуемыми полиморфизмами и риском развития СДР проводили между общей выборкой недоношенных детей (основная группа) и группой сравнения (табл. 2).

Обнаружено, что генотип -735CC и мажорный аллель С достоверно чаще (OR = 0,52; 95% CI: 0,32–0,82; $p = 0,0054$ и OR = 0,51; 95% CI: 0,29–0,90; $p = 0,022$ соответственно) встречались в группе доношенных новорожденных, а генотип -735CT и минорный аллель Т — достоверно чаще в основной группе (OR = 1,69; 95% CI: 1,05–2,71; $p = 0,033$ и OR = 1,95; 95% CI: 1,11–3,43; $p = 0,022$). Можно предположить, что носительство генотипа СТ и аллеля Т полиморфизма rs2285053 является рисковым фактором в развитии СДР. Анализ распределения частоты встречаемости полиморфных вариантов rs243866, rs17576, rs3918242 у пациентов с СДР и в контрольной группе не выявил достоверных различий.

Таблица 1

Праймеры и эндонуклеазы рестрикции, использованные в работе

Полиморфизм	Праймеры 5'-3'	Длина продукта, п. н.	Рестриктаза	Длина ПДРФ-фрагментов, п. н. (аллель)
-735 C>T <i>MMP2</i>	F: ATAGGGTAAACCTCCCCACATT R: GCGTTAGAGACGTTGGAACC	349	HinfI	320+29 (C) 255+65+29 (T)
-1575 G>A <i>MMP2</i>	F: GTCTGAAGCCCACTGAGACC R: CTAGGAAGGGGCGAGATAGG	175	NlaIII	175 (G) 112+63 (A)
-1562 C>T <i>MMP9</i>	F: ACGGTGCTTGACACAGTAAATCT R: GGCAGGGTCTATATTCACCTTCT	652	SphI	652 (C) 431+221 (T)
с.836 A>G <i>MMP9</i>	F: AATTCACCCTCCCGCACTCT R: GTTTTGGGGGCCAATACATGA	397	SmaI	397 (A) 224+173 (G)

Таблица 2
Распределение частот полиморфных вариантов -735 C>T, -1575 G>A гена MMP2 и с.836A>G, -1562 C>T гена MMP9 у
недоношенных новорожденных с СДР и в группе сравнения с учетом и без учета пола

Генотип	Группа сравнения, n = 189	Основная группа, n = 188	OR (95% CI)	p	Мальчики			Девочки				
					Группа сравнения, n = 96	Основная группа, n = 95	OR (95% CI)	p	Группа сравнения, n = 93	Основная группа, n = 93	OR (95% CI)	p
-735 C>T (rs2285053) MMP2												
C/C	150 (79,4%)	125 (66,5%)	0,52 (0,32–0,82)	0,007	73 (76%)	61 (64,2%)	0,57 (0,30–1,06)	0,1	77 (82,8%)	64 (68,8%)	0,46 (0,23–0,92)	0,052
C/T	38 (20,1%)	56 (29,8%)	1,69 (1,05–2,71)		23 (24%)	32 (33,7%)	1,61 (0,86–3,04)		15 (16,1%)	24 (25,8%)	1,81 (0,88–3,72)	
T/T	1 (0,5%)	7 (3,7%)	7,27 (0,89–59,69)		0 (0%)	2 (2,1%)	NA (0,00–NA)		1 (1,1%)	5 (5,4%)	5,23 (0,60–45,64)	
C	134 (87,0%)	172 (77,5%)	0,51 (0,29–0,90)	0,02	169 (88,0%)	154 (81,1%)	0,58 (0,33–1,03)	0,06	169 (90,9%)	152 (81,7%)	0,45 (0,24–0,84)	0,01
T	20 (13,0%)	50 (22,5%)	1,95 (1,11–3,43)		23 (12,0%)	36 (18,9%)	1,72 (0,97–3,03)		17 (9,1%)	34 (18,3%)	2,22 (1,19–4,14)	
-1575 G>A (rs243866) MMP2												
G/G	105 (55,6%)	103 (54,8%)	0,97 (0,65–1,46)	0,99	60 (62,5%)	56 (59,0%)	0,86 (0,48–1,54)	0,87	45 (48,4%)	47 (50,5%)	1,09 (0,61–1,94)	0,95
G/A	71 (37,6%)	72 (38,3%)	1,03 (0,68–1,56)		31 (32,3%)	34 (35,8%)	1,17 (0,64–2,13)		40 (43,0%)	38 (40,9%)	0,92 (0,51–1,64)	
A/A	13 (6,8%)	13 (6,9%)	1,01 (0,45–2,23)		5 (5,2%)	5 (5,2%)	1,01 (0,28–3,61)		8 (8,6%)	8 (8,6%)	1,00 (0,36–2,79)	
G	281 (74,3%)	278 (73,9%)	0,98 (0,71–1,36)	0,90	151 (78,6%)	146 (76,8%)	0,90 (0,57–1,46)	0,67	130 (69,9%)	132 (71,0%)	1,05 (0,68–1,64)	0,82
A	97 (25,7%)	98 (26,1%)	1,02 (0,74–1,42)		41 (21,4%)	44 (23,2%)	1,11 (0,69–1,80)		56 (30,1%)	54 (29,0%)	0,95 (0,61–1,48)	
с.836 A>G p.Gln279Arg (rs17576) MMP9												
G/G	56 (29,6%)	62 (33,0%)	1,17 (0,77–1,81)	0,61	35 (36,5%)	28 (29,5%)	0,73 (0,40–1,34)	0,58	21 (22,6%)	34 (36,6%)	1,98 (1,04–3,76)	0,061
G/A	93 (49,2%)	83 (44,1%)	0,82 (0,54–1,22)		39 (40,6%)	44 (46,3%)	1,26 (0,71–2,24)		54 (58,1%)	39 (41,9%)	0,52 (0,29–0,93)	
A/A	40 (21,2%)	43 (22,9%)	1,10 (0,68–1,80)		22 (22,9%)	23 (24,2%)	1,07 (0,55–2,10)		18 (19,3%)	20 (21,5%)	1,14 (0,56–2,33)	
G	205 (54,2%)	207 (55,1%)	1,03 (0,78–1,38)	0,82	109 (56,8%)	100 (52,6%)	0,85 (0,57–1,27)	0,42	96 (51,6%)	107 (57,5%)	1,27 (0,84–1,91)	0,25
A	173 (45,8%)	169 (44,9%)	0,97 (0,73–1,29)		83 (43,2%)	90 (47,4%)	1,18 (0,79–1,77)		90 (48,4%)	79 (42,5%)	0,79 (0,52–1,19)	
-1562 C>T (rs3918242) MMP9												
C/C	120 (63,5%)	132 (70,2%)	1,40 (0,91–2,14)	0,61	63 (65,6%)	66 (69,5%)	1,19 (0,65–2,19)	0,72	57 (61,3%)	66 (71,0%)	1,54 (0,84–2,85)	0,36
C/T	64 (33,9%)	50 (26,6%)	0,71 (0,45–1,10)		30 (31,3%)	25 (26,3%)	0,79 (0,42–1,47)		34 (36,6%)	25 (26,9%)	0,64 (0,34–1,19)	
T/T	5 (2,6%)	6 (3,2%)	1,21 (0,36–4,05)		3 (3,1%)	4 (4,2%)	1,36 (0,30–6,26)		2 (2,1%)	2 (2,1%)	1,00 (0,14–7,25)	
C	304 (80,4%)	314 (83,5%)	1,23 (0,85–1,79)	0,27	156 (81,3%)	157 (82,6%)	1,10 (0,65–1,85)	0,73	148 (79,6%)	157 (84,4%)	1,39 (0,82–2,37)	0,23
T	74 (19,6%)	62 (16,5%)	0,81 (0,56–1,18)		36 (18,8%)	33 (17,4%)	0,91 (0,54–1,54)		38 (20,4%)	29 (15,6%)	0,72 (0,42–1,23)	

Примечание. Выделение жирным шрифтом соответствует $p \leq 0,05$

Известно, что экспрессия и активность ММП регулируется половыми гормонами [8]. Поэтому проведено сравнение встречаемости генотипов исследуемых полиморфных вариантов между основной группой и группой сравнения с учетом пола (табл. 2). В группе мальчиков достоверных различий распределения частоты встречаемости полиморфных вариантов исследуемых локусов выявлено не было. В группе девочек выявлены достоверные различия по полиморфному варианту rs2285053 гена *MMP2*: генотип -735CC достоверно чаще (OR = 0,46; 95% CI: 0,23–0,92; $p = 0,039$) встречался в группе доношенных девочек. Как и при анализе основной группы без учета пола мажорный аллель С полиморфизма rs2285053 достоверно чаще встречался у доношенных девочек, а минорный аллель Т — у девочек с СДР ($p = 0,011$).

Также было обнаружено, что генотип 836GA rs17576 *MMP9* достоверно чаще встречался у доношенных девочек (OR = 0,52; 95% CI: 0,29–0,93; $p = 0,40$), в то время как генотип 836GG *MMP9* — у недоношенных девочек: OR = 1,98; 95% CI: 1,04–3,76; $p = 0,053$, однако статистическая достоверность не была достигнута (рис. 2).

Был проведен анализ связи исследуемых полиморфизмов с полом как в основной группе, так и в контрольной (расчетные данные не

приведены). Отличия между мальчиками и девочками в группе недоношенных новорожденных выявлены не были. В группе доношенных новорожденных выявлены достоверные различия по распределению полиморфных вариантов rs17576 гена *MMP9*: у мальчиков генотип 836GG встречался в 1,62 раза достоверно чаще (OR = 1,97; 95% CI: 1,04–3,73; $p = 0,04$) чем у девочек; у девочек достоверно чаще встречался генотип 836GA: OR = 0,49; 95% CI: 0,28–0,88; $p = 0,02$ (рис. 2).

На следующем этапе проводился анализ связи изучаемых полиморфизмов с тяжестью течения синдрома дыхательных расстройств у недоношенных новорожденных (табл. 3). Учитывая, что в исследуемой группе пациентов с СДР выявлено влияние гестационного срока на тяжесть течения СДР, нами был проведен анализ частот встречаемости генотипов и аллелей -735 C>T (rs2285053), -1575 G>A (rs243866) гена *MMP2* и с.836 A>G p.Gln279Arg (rs17576), -1562 C>T (rs3918242) у пациентов основной группы со сроком гестации 28–32 недели и со сроком гестации 32–36 недель. Проведенный анализ не выявил достоверных различий в частотах распределения полиморфных вариантов изучаемых локусов в зависимости от гестационного срока пациентов (расчетные данные не представлены).

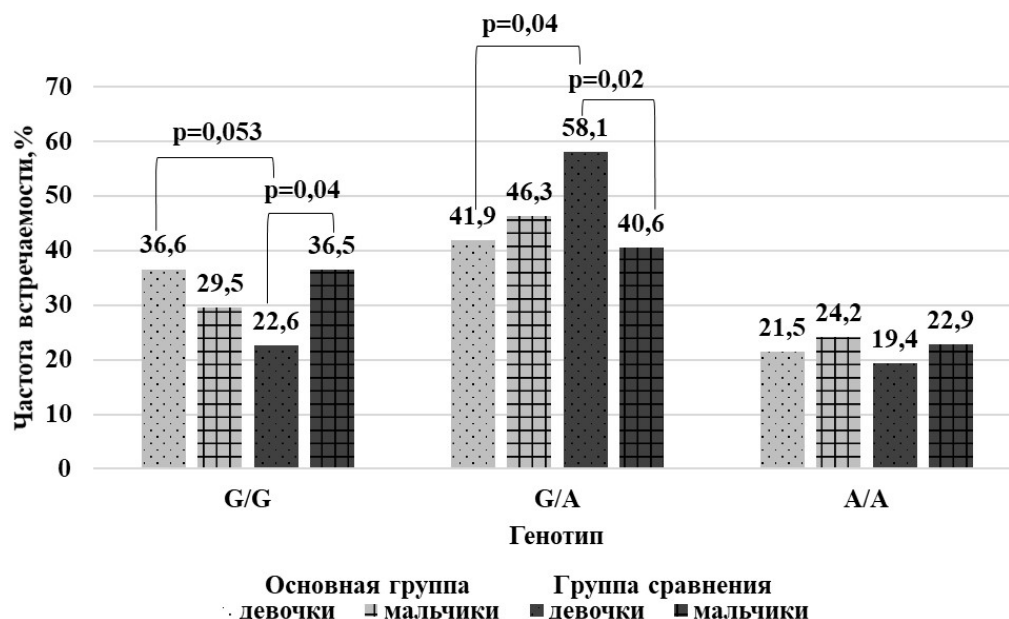


Рис. 2. Распределение частоты встречаемости генотипов полиморфизма rs17576 гена *MMP9* в исследуемой группе и в группе сравнения с учетом пола

Таблица 3
Частота встречаемости генотипов и аллелей полиморфизмов генов MMP2 и MMP9 у недоношенных новорожденных с СДР различной степени тяжести с учетом и без учета пола

Генотип	СДР умеренный, n = 77	СДР тяжелый, n = 111	OR (95% CI)	p	Мальчики			Девочки					
					СДР умеренный, n = 38	СДР тяжелый, n = 57	OR (95% CI)	p	СДР умеренный, n = 40	СДР тяжелый, n = 53	OR (95% CI)	p	
-735 C>T (rs2285053) MMP2													
C/C	59 (76,6%)	66 (59,5%)	0,45 (0,23–0,86)	0,05	27 (71,1%)	34 (59,6%)	0,63 (0,26–1,52)	0,46	32 (80,0%)	32 (60,4%)	0,38 (0,18–0,99)	0,12	
C/T	16 (20,8%)	40 (36,0%)	2,15 (1,10–4,21)		10 (26,3%)	22 (38,6%)	1,76 (0,72–4,32)		7 (17,5%)	17 (32,1%)	2,23 (0,82–6,05)		
T/T	2 (2,6%)	5 (4,5%)	1,77 (0,33–9,36)		1 (2,6%)	1 (1,8%)	0,66 (0,04–10,90)		1 (2,5%)	4 (7,5%)	3,18 (0,34–29,65)		
C	134 (87,0%)	172 (77,5%)	0,51 (0,29–0,90)	0,02	64 (84,2%)	90 (78,9%)	0,70 (0,33–1,51)	0,37	71 (88,8%)	81 (76,4%)	0,41 (0,18–0,94)	0,032	
T	20 (13,0%)	50 (22,5%)	1,95 (1,11–3,43)		12 (15,8%)	24 (21,1%)	1,42 (0,66–3,05)		9 (11,3%)	25 (23,6%)	2,44 (1,07–5,56)		
-1575 G>A (rs243866) MMP2													
G/G	36 (46,8%)	67 (60,4%)	1,73 (0,96–3,12)	0,046	17 (44,7%)	39 (68,4%)	2,68 (1,15–6,26)	0,032	19 (47,5%)	28 (52,8%)	1,24 (0,54–2,82)	0,5	
G/A	32 (41,5%)	40 (36,0%)	0,79 (0,44–1,44)		17 (44,7%)	17 (29,8%)	0,53 (0,22–1,23)		16 (40,0%)	22 (41,5%)	1,06 (0,46–2,46)		
A/A	9 (11,7%)	4 (3,6%)	0,28 (0,08–0,95)		4 (10,6%)	1 (1,8%)	0,15 (0,02–1,41)		5 (12,5%)	3 (5,7%)	0,42 (0,09–1,87)		
G	104 (67,5%)	174 (78,4%)	1,74 (1,10–2,77)	0,019	51 (67,1%)	95 (83,3%)	2,45 (1,23–4,87)	0,01	54(67,5%)	78 (73,6%)	1,31 (0,71–2,54)	0,37	
A	50 (32,5%)	48 (21,6%)	0,57 (0,36–0,91)		25 (32,9%)	19 (16,7%)	0,41 (0,21–0,81)		26 (32,5%)	28 (26,4%)	0,75 (0,39–1,41)		
c.836 A>G p.Gln279Arg (rs17576) MMP9													
G/G	20 (26,0%)	42 (37,8%)	1,74 (0,92–3,28)	0,2	7 (18,4%)	21 (36,8%)	2,58 (0,97–6,89)	0,11	14 (35,0%)	20 (37,7%)	1,13 (0,48–2,65)	0,96	
G/A	39 (50,6%)	44 (39,6%)	0,64 (0,36–1,15)		22 (57,9%)	22 (38,6%)	0,46 (0,20–1,05)		17 (42,5%)	22 (41,5%)	0,96 (0,42–2,21)		
A/A	18 (23,4%)	25 (22,6%)	0,95 (0,48–1,90)		9 (23,7%)	14 (24,6%)	1,05 (0,40–2,74)		9 (22,5%)	11 (20,8%)	0,90 (0,33–2,44)		
G	79 (51,3%)	128 (57,7%)	1,29 (0,86–1,95)	0,22	36 (47,4%)	64 (56,1%)	1,42 (0,79–2,55)	0,24	45 (56,3%)	62 (58,5%)	1,10 (0,61–1,97)	0,76	
A	75 (48,7%)	94 (42,3%)	0,77 (0,51–1,17)		40 (52,6%)	50 (43,9%)	0,70 (0,39–1,26)		35 (43,8%)	44 (41,5%)	0,91 (0,51–1,64)		
-1562 C>T (rs3918242) MMP9													
C/C	56 (72,7%)	76 (68,5%)	0,81 (0,43–1,55)	0,18	27 (71,1%)	39 (68,4%)	0,88 (0,36–2,16)	0,24	30 (75,0%)	36 (67,9%)	0,71 (0,28–1,77)	0,42	
C/T	21 (27,3%)	29 (26,1%)	0,94 (0,49–1,82)		11 (28,9%)	14 (24,6%)	0,80 (0,32–2,01)		10 (25,0%)	15 (28,3%)	1,18 (0,47–3,01)		
T/T	0 (0%)	6 (5,4%)	NA (0,00–NA)		0 (0%)	4 (7,0%)	NA (0,00–NA)		0 (0%)	2 (3,8%)	NA (0,00–NA)		
C	133 (86,4%)	181 (81,5%)	0,70 (0,39–1,24)	0,22	65 (85,5%)	92 (80,7%)	0,71 (0,32–1,56)	0,39	70 (87,5%)	87 (82,1%)	0,65 (0,29–1,50)	0,31	
T	21 (13,6%)	41 (18,5%)	1,44 (0,81–2,54)		11 (14,5%)	22 (19,3%)	1,41 (0,64–3,16)		10 (12,5%)	19 (174,9%)	1,53 (0,67–3,50)		

Примечание. Выделение жирным шрифтом соответствует $p \leq 0,05$

Анализ ассоциации изучаемых генотипов показал, что рисковыми аллелями в развитии тяжелого СДР являлись аллели -735T ($p = 0,020$), -1575G ($p = 0,019$) и генотип -735CT (OR = 2,15; 95% CI: 1,10–4,21; $p = 0,035$) гена *MMP2*. Интересным оказался результат поиска ассоциации между исследуемыми генотипами и тяжестью течения СДР с учетом пола. Так, у мальчиков обнаружен рисковый аллель -1575G ($p = 0,010$) и генотип -1575GG (OR = 2,68; 95% CI: 1,15–6,26; $p = 0,033$) полиморфизма rs243866 *MMP2*, а у девочек — рисковый аллель -735T ($p = 0,032$) полиморфизма rs2285053 *MMP2*. Найденные рисковые аллели оказывают противоположное действие на экспрессию *MMP2*: -1575G повышает, а -735T снижает экспрессию гена. Низкая ферментативная активность протеиназы ММР2 является фактором риска развития дыхательных нарушений у недоношенных новорожденных [7]. Известно, что у недоношенных мальчиков достоверно выше содержание эстрадиола в пуповинной крови, чем у девочек [17], а эстрогены влияют на активность ММР (снижают), повышая экспрессию тканевых ингибиторов матриксных металлопротеиназ.

Далее был проведен анализ сравнения комбинаций генотипов по полиморфизмам генов

MMP2 и *MMP9* у пациентов с СДР различной степени тяжести (рис. 3, рис. 4).

Комбинация генотипов -735CC rs2285053 и -1575A- rs243866 гена *MMP2* достоверно чаще встречалась у пациентов с СДР умеренной степени тяжести (OR = 0,47; 95% CI: 0,25–0,86; $p = 0,019$), а частота встречаемости комбинации генотипов CT/GG этих же полиморфных локусов была выше у пациентов с тяжелым течением СДР, однако статистическая достоверность не была достигнута (OR = 2,12; 95% CI: 0,98–4,56; $p = 0,051$). Полученные результаты подтверждают гипотезу о рисковом значении генотипа CT и аллеля T полиморфизма rs2285053 и защитном эффекте при носительстве генотипа -735CC rs2285053 и аллеля -1575A rs243866 в развитии СДР тяжелой степени.

При анализе ассоциации комбинаций полиморфных локусов rs17576 и rs3918242 гена *MMP9* со степенью тяжести СДР выявлено, что комбинация генотипов AA/CC встречалась в 2,1 раза реже у пациентов с тяжелым СДР (OR = 0,45; 95% CI: 0,17–0,97; $p = 0,038$). Можно предположить наличие кумулятивного влияния сочетания полиморфных вариантов локуса rs17576 и rs3918242 гена *MMP9* на тяжесть течения СДР у недоношенных новорожденных.

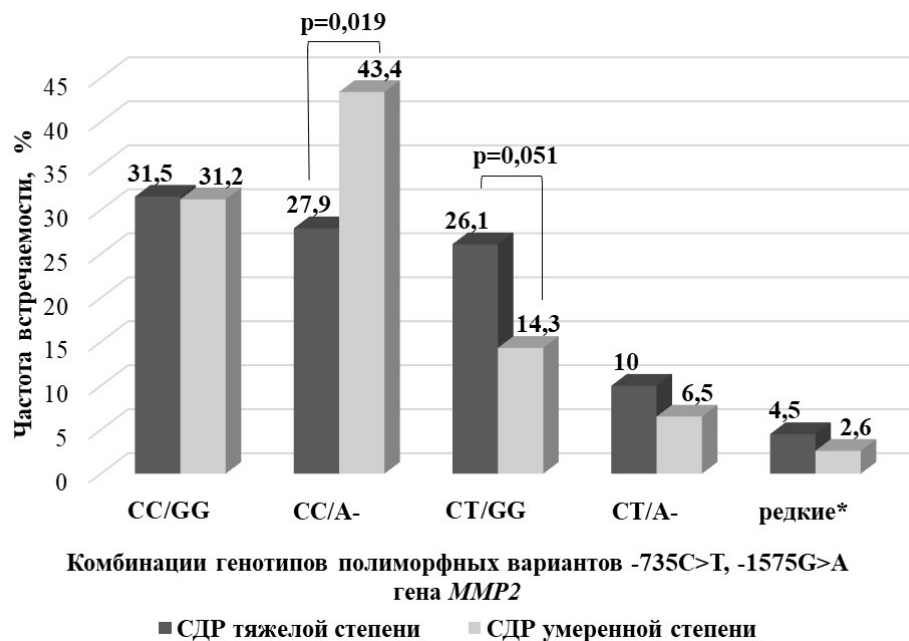


Рис. 3. Распределение частоты встречаемости комбинаций генотипов полиморфных локусов гена *MMP2* в основной группе пациентов с разделением по степени тяжести СДР

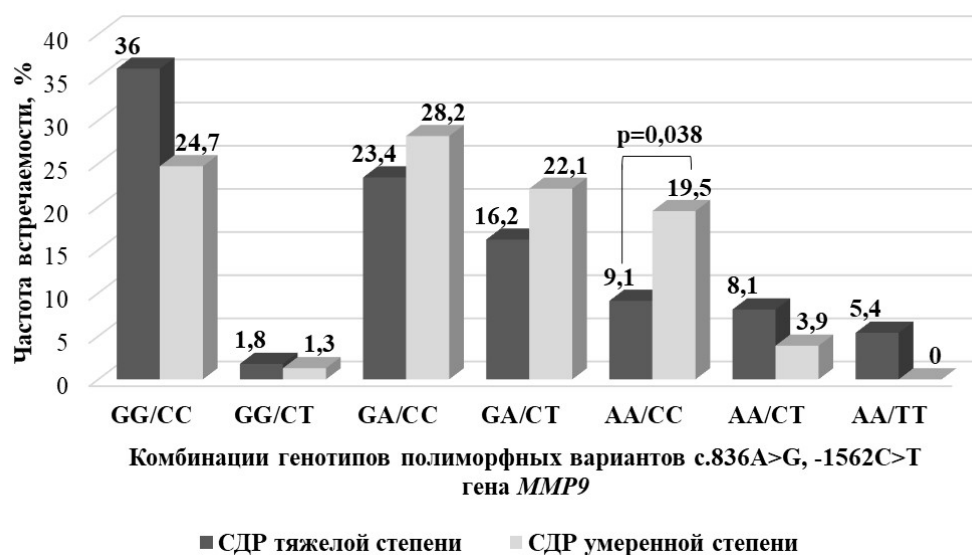


Рис. 4. Распределение частоты встречаемости комбинаций генотипов полиморфных локусов гена *MMP9* в основной группе пациентов с разделением по степени тяжести СДР

Полученные данные об аллелях и генотипах полиморфных вариантов матриксных металлопротеиназ, достоверно ассоциированных с риском развития респираторных заболеваний с учетом пола представлены на рисунке 5.

Полиморфизмы в генах ММП могут изменять экспрессию генов, влияя на взаимодействие между факторами транскрипции и сайтами их связывания в промоторной области, что может способствовать повышенной восприимчивости к развитию различных патологий. В случае гена *MMP2* в его промоторной области картированы 2 функциональных однонуклеотидных полиморфизма: -735 C>T (rs2285053) и -1575 G>A (rs243866). Полиморфный вариант в положении -735 представляет собой замену цитозина на тимин, что приводит к устранению сайта связывания транскрипционного фактора Sp-1, причем аллель Т связан с уменьшенной актив-

ностью промотора. Замена гуанина на аденин в положении -1575 промотора *MMP2* нарушает связывание эстрогенового рецептора, а также приводит к снижению транскрипционной активности (аллель -1575G функционирует как энхансер, тогда как аллель -1575А снижает активность транскрипции). Однонуклеотидный полиморфизм в промоторной области гена *MMP9* в положении -1562 (rs3918242) представляет собой замену цитозина на тимин и находится в сайте узнавания ингибиторов транскрипции. Следовательно, замена С на Т приводит к разрушению сайта связывания ингибитора и значительно увеличивает активность промотора. Несинонимичный вариант с.836 A>G p.Gln279Arg (rs17576) гена *MMP9* представляет замену аденина на гуанин в положении с.836, в результате чего незаряженный глутамин замещается на положительно заряженный аргинин в положении 279 зрелого белка. Этот полиморфизм влияет на конформацию белка, вызывая снижение аффинности связывания коллагена типа IV с ММП9 [18–21]. Возможно, этим обусловлена защитная роль комбинации генотипов AA/CC гена *MMP9* в тяжести течения синдрома дыхательных расстройств у недоношенных новорожденных.

Роль ММП2 в патофизиологии дыхательных нарушений у недоношенных новорожденных спорна. Исследования экспрессии ММП у недоношенных детей, указывают на

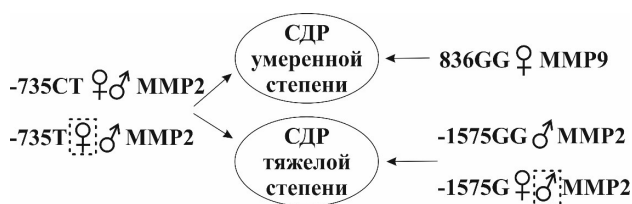


Рис. 5. Генотипы и аллели полиморфных вариантов генов *MMP2* и *MMP9*, ассоциированные с риском развития респираторных нарушений (пунктиром выделены генотипы, проявившие себя только в одном из полов при анализе данных с учетом пола)

то, что риск развития респираторных осложнений обусловлен несколькими факторами, в том числе повышенной экспрессией ММП2 в течение первых трех дней жизни. Сочетание более высокой концентрации ММП2 и более низкой концентрации сурфактанта приводит к недостаточной защите от окислительного повреждения, вызванного искусственной вентиляцией легких.

Существуют разные мнения по поводу роли ММП9 в развитии респираторных нарушений [13–15]. Так, повышенные уровни ММП9 в трахее в ранние сроки после рождения коррелировали с разрешением СДР, что позволяет предположить, что повышение активности ММП9 является реакцией физиологического восстановления, защитой легкого от воспалительного повреждения.

Заключение

Выявлено влияние полиморфных вариантов rs2285053 гена *MMP2* на риск развития и формы течения СДР: носительство генотипа -735СТ и аллеля -735Т является фактором риска развития и формирования тяжелой формы СДР у недоношенных новорожденных.

Генотипы -735СС rs2285053, -1575АА rs243866, а также комбинации генотипов 836АА/-1562СС гена *MMP9* и -735СС/-1575А гена *MMP2* достоверно чаще встречаются у недоношенных новорожденных с СДР умеренной степени тяжести.

Выявлены статистически значимые различия в ассоциации полиморфных вариантов изучаемых локусов с развитием и течением респираторных нарушений с учетом пола. Показано, что генотип 836GG rs17576 гена *MMP9* является рисковым в развитии СДР для девочек. Степень тяжести течения СДР у девочек ассоциировалась с аллелем -735Т rs2285053, а у мальчиков — с аллелем -1575G rs243866 гена *MMP2*.

Список использованных источников

1. Современные аспекты организации неонатальной помощи / Громов К. Л. [и др.] ; под ред. Д. О. Иванова, Ю. В. Петренко. – СПб. : Н-Л, 2011. – 463 с.

2. Суханова, Л. П. Детская и перинатальная смертность в России: тенденции, структура, факторы риска [Электронный ре-

сурс] / Л. П. Суханова, М. С. Скляр // Социальные аспекты здоровья населения. – 2007. – № 4. – Режим доступа: <http://vestnik.mednet.ru/content/view/46/3>. – Дата доступа: 20.05.2020.

3. Сидельникова, В. М. Преждевременные роды. Недоношенный ребёнок / В. М. Сидельникова, А. Г. Антонов. – М. : Изд. группа «ГЭОТАР Медиа», 2006. – 371 с.

4. Практическая пульмонология детского возраста (справочник) / В. К. Таточенко [и др.] ; под ред. В. К. Таточенко. – М., 2000. – 268 с.

5. Дементьева, Г. М. Пульмонологические проблемы в неонатологии / Г. М. Дементьева // Пульмонология. – 2002. – № 1. – С. 6–12.

6. Risk factors for the different types of chronic lung diseases of prematurity according to the preceding respiratory distress syndrome / C. W. Choi [et al.] // *Pediatr. Int.* – 2005. – Vol. 47. – P. 417–423.

7. Hendrix, A. Y. The role of matrix metalloproteinases in development, repair, and destruction of the lungs / A. Y. Hendrix, F. Kheradmand // *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* – 2017. – Vol. 148. – P. 1–29.

8. Extracellular matrix in lung development, homeostasis and disease / Y. Zhou [et al.] // *Matrix Biology.* – 2018. – Vol. 73. – P. 77–104.

9. Mižíková, I. The extracellular matrix in bronchopulmonary dysplasia: target and source [Electronic resource] / I. Mižíková, R. E. Morty // *Frontiers in Medicine.* – 2015. – Vol. 2. – Article 91. – Mode of access: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmed.2015.00091/full>. – Date of access: 27.04.2020.

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

11. Genetic polymorphisms in MMP 2, 9 and 3 genes modify lung cancer risk and survival / P. González-Arriaga [et al.] // *BMC Cancer.* – 2012. – Vol. 12, № 121. – P. 1–10.

12. Functional polymorphisms in the promoter regions of MMP2 and MMP3 are not associated with melanoma progression / J. Cotignola [et al.] // *Journal of Negative Results in BioMedicine.* – 2007. – Vol. 6, № 1. – P. 1–8.

13. The MMP-2 and MMP-9 promoter polymorphisms and susceptibility to salivary gland

- cancer / M. Radunovic [et al.] // JBUON. – 2016. – Vol. 21, № 3. – P. 597–602.
14. Association study of polymorphisms with in matrix metalloproteinase 9 with bronchial asthma/ K. Ganter [et al.] // Int. J. Immunogenet. – 2005. – Vol. 32. – P. 233–236.
15. MMP9 promoter polymorphism (-1562 C/T) does not affect the serum levels of soluble MICB and MICA in breast cancer / M. H. Bargostavan [et al.] // Iran. J. Immunol. – 2016. – Vol. 13. – P. 45–53.
16. SNPStats: your web tool for SNP analysis [Electronic resource]. – Mode of access: <https://www.snpstats.net/start.htm?>. – Date of access: 28.04.2020.
17. Елгина, С. И. Функциональные взаимоотношения между гонадотропногонадной системой и плацентой у доношенных и недоношенных новорожденных / С. И. Елгина // Казанский медицинский журнал. – 2010. – Т. 91, № 1. – С. 59–61.
18. Matrix metalloproteinases: evolution, gene regulation and functional analysis in mouse models / M. Fanjul-Fernández [et al.] // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Molecular Cell Research. – 2010. – Vol. 1803. – P. 3–19.
19. Amaya, C. N. Differential expression of angiogenic gene networks during post-natal lung alveolarization [Electronic resource] / C. N. Amaya, B. A. Bryan // Angiol. – 2016. – Vol. 4, Issue 4. – Mode of access: <https://www.longdom.org/open-access/differential-expression-of-angiogenic-gene-networks-during-post-natal-lungalveolarization-2329-9495-1000187.pdf>. – Date of access: 27.04.2020.
20. Matrix metalloproteinase gene polymorphisms and bronchopulmonary dysplasia: identification of MMP16 as a new player in lung development [Electronic resource] / A. Hadchouel [et al.] // PLoS ONE. – 2008. – Vol. 3. – Mode of access: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0003188>. – Date of access: 27.04.2020.
21. Association of a FGFR-4 gene polymorphism with bronchopulmonary dysplasia and neonatal respiratory distress / M. Rezvani [et al.] // Disease Markers. – 2013. – Vol. 35. – P. 633–640.

V. M. Malysheva¹, A. P. Mikhalenka¹, M. V. Artsiusheuskaya³, A. P. Sukharava^{2,3}, K. A. Gamolka^{2,3},
A. V. Kilchevsky¹, G. A. Shyshko³

POLYMORPHISMS OF *MMP2* AND *MMP9* GENES IN PREMATURE NEWBORNS WITH RESPIRATORY DISTRESS SYNDROME

¹State Scientific Institution

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

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

email: o.malysheva@igc.by

²State Educational Establishment “Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education”

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

³Health Care Institution “Clinical Maternity Hospital of Minsk Region”

16, F. Skoriny St., 220114 Minsk, the Republic of Belarus

The incidence of -735 C>T rs2285053, -1575 G>A rs243866 *MMP2* and c.836 A>G p.Gln279Arg rs17576, -1562 C>T rs3918242 polymorphic variants of the *MMP9* gene were investigated in 188 premature newborns of 28–36 weeks of gestational age with respiratory distress syndrome and in 189 mature newborns (the control group). A statistically significant increase in the incidence of the heterozygous genotype -735CT was found in the group of premature newborns with respiratory disorders as compared with the control group ($p = 0.033$) and in newborns with severe RDS as compared with moderate RDS ($p = 0.035$). The severity of RDS in girls was associated with the -735T allele and in boys with -1575G of the *MMP2* gene. It was shown that the 836GG rs17576 genotype of the *MMP9* gene is a risk factor of RDS development in girls. Combinations of 836AA / -1562CC of the *MMP9* gene and -735CC / -1575A- of the *MMP2* gene occurred more frequently in patients with the moderate severity of RDS ($p = 0.038$ and $p = 0.019$ respectively).

Keywords: respiratory distress syndrome, bronchopulmonary dysplasia, premature newborns, matrix metalloproteinases, *MMP2* and *MMP9* gene polymorphism.

В. Н. Кипень¹, М. В. Богданова¹, А. А. Буракова¹, О. В. Зотова^{1,2}, О. И. Добыш¹, Т. С. Королева²,
А. В. Байда³, А. Г. Булгак², С. А. Брускин⁴, В. А. Лемеш¹

ПРЕДСКАЗАТЕЛЬНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ CpG-МАРКЕРОВ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ХРОНОЛОГИЧЕСКОГО ВОЗРАСТА ЧЕЛОВЕКА

¹Государственное научное учреждение

«Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси»

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

e-mail: V.Lemesh@igc.by

²Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр «Кардиология»

Министерства здравоохранения Республики Беларусь»

Республика Беларусь, 220089, г. Минск, ул. Розы Люксембург, 110Б

³Государственное учреждение образования

«Белорусская медицинская академия последипломного образования»

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

⁴Федеральное государственное бюджетное учреждение науки

«Институт общей генетики им. Н. И. Вавилова Российской академии наук»

Российская Федерация, 117791, г. Москва, ул. Губкина, 3

На основании данных, представленных в открытом доступе на платформе GEO-NCBI для 8 проектов по определению полногеномного профиля метилирования ДНК с использованием Infinium Human Methylation 450K BeadChip (Illumina®), рассчитаны коэффициенты корреляции в отношении возраста для 7 CpG-маркеров cg18384097 (ген *PTPN7*), cg00481951 (ген *SST*), cg19671120 (ген *CNGA3*), cg14361627 (ген *KLF14*), cg08928145 (ген *TSSK6*), cg12757011 (ген *TBR1*), cg07547549 (ген *SLC12A5*) для 690 индивидов без наличия хронических и острых заболеваний в анамнезе. Наибольшим предсказательным потенциалом для определения хронологического возраста обладают CpG-маркеры cg00481951 (ген *SST*) и cg14361627 (ген *KLF14*), при совокупном анализе на них приходится 62,9–74,5% и 62,7–73,8% дисперсии переменной «Возраст, кол-во лет» соответственно. При анализе же всех 7 CpG-маркеров объясненная в рамках регрессионной модели дисперсия переменной «Возраст, кол-во лет» варьирует в пределах 75,9–94,5%.

Ключевые слова: метилирование ДНК, буккальный эпителий, определение возраста, HumanMethylation450 BeadChip, судебная эпигенетика.

Введение

Определение хронологического возраста по образцам биологических жидкостей и фрагментам тканей играет важную роль в криминалистической практике: оно может ограничить круг поисков при идентификации останков, помочь сузить круг подозреваемых, тем самым сэкономив время, которое зачастую является лимитирующим фактором для успешного расследования. Для решения задачи по определению хронологического возраста человека самым надежным, а именно: воспроизводимым, линейно-зависимым, чувствительным и специфичным, — а также экономически оправданным является подход к

определению хронологического возраста, основанный на выявлении уровня метилирования ДНК в конкретных CpG-сайтах [1, 2].

Одним из самых распространенных биологических образцов криминалистического характера является буккальный эпителий (или слюна). В мире предложено несколько методик определения возраста индивида по уровню прижизненной химической модификации (метилированию) избранных участков его ДНК, отличающихся количеством исследуемых маркеров и методом анализа, с заявляемой точностью до 3–12 лет [3–15]. Однако применимость указанных методик для определения возраста

представителей населения регионов Союзного государства не установлена, ведь, как было продемонстрировано в ряде исследований, уровень метилирования конкретных CpG-маркеров может различаться в зависимости от этногеографического происхождения исследуемых индивидов [16].

Современные методы изучения метилирования ДНК на уровне генома предполагают использование одной из двух технологических платформ высокопроизводительного анализа нуклеотидных последовательностей — гибридизации ДНК на микрочипах (microarray) либо параллельного клонального секвенирования ДНК (Massive parallel sequencing — MPS или Next generation sequencing — NGS). Гибридизационные микрочипы остаются наиболее популярной платформой геномного анализа метилирования ДНК.

По состоянию на начало 2019 г. компания Illumina® выпускает для научных исследований уже третье поколение гибридизационных чипов для анализа полногеномного профиля метилирования ДНК человека. Однако именно для чипов второго поколения — ILM 450K BeadChip — на данный момент накоплен наибольший массив первичных данных как для различных типов биологических образцов (кровь, отдельные клеточные фракции крови, буккальный эпителий (слюна), сперма), так и для различных этнических групп или пациентов с хроническими заболеваниями в анамнезе (онкологические заболевания, диабет, метаболический синдром, артериальная гипертензия). Платформа ILM 450K BeadChip рассчитана на анализ состояния метилирования 482421 CpG сайтов и покрывает 99% генов RefSeq GCF_000001405.39 (в среднем по 17 CpG динуклеотидов на ген).

Биологический возраст, отражающий степень морфологического и физиологического развития организма, в контексте метилирования ДНК имеет тренд, как правило, отличный от линейного. Данный факт обусловлен рядом причин [6, 17–19]: гипер- и/или гиподифференцированной экспрессией генов в процессе интенсивного роста организма в допубертатный и раннепубертатный периоды, наличием хронических заболеваний (бронхиальная астма, рассеянный склероз, эпилепсия, сахарный диабет, онкозаболевания и др.), геронтологи-

ческими процессами, наличием вредных привычек (табакокурение, избыточное употребление алкоголя) и др. Отклонения изменения профиля метилирования от линейного тренда для биологического возраста, связанные с ростом и старением организма, наиболее выражены в возрасте до 18–23 лет и после 60 лет. Однако точности линейного тренда (множественная линейная регрессия), как правило, бывает достаточно, чтобы с высокой точностью предсказать возраст в широком возрастном диапазоне.

Одной из целей выполнения научно-исследовательских работ в рамках Научно-технологической программы Союзного государства «Разработка инновационных геногеографических и геномных технологий идентификации личности и индивидуальных особенностей человека на основе изучения генофондов регионов Союзного государства» («ДНК-идентификация») по Мероприятию «Разработка методики определения вероятного возраста индивида по характеристике его ДНК» является анализ современного состояния науки в данной области исследований и разработка возможных подходов к определению возраста неизвестного индивида по прижизненной химической модификации (метилированию) избранных участков его ДНК.

Таким образом, цель настоящей работы — анализ предсказательного потенциала CpG-маркеров для определения хронологического возраста индивида в контексте его половой и этногеографической принадлежности.

Материалы и методы

Образцы ДНК. Общее количество включенных в исследование образцов буккального эпителия, для которых имелась информация об уровне метилирования с использованием ILM 450K BeadChip, составило 872 образца. Информация была представлена в открытом доступе на платформе NCBI GEO datasets (Gene Expression Omnibus, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gds>) для следующих проектов: GSE59505 [11] (2014 г.; страна-исполнитель — Южная Корея) — 6 образцов (здоровые индивиды); GSE72120 [20] (2015 г., Великобритания) — 72 образца (новорожденные без признаков патологии в анамнезе); GSE72556 (2015 г., США) — 96

образцов (дети дошкольного возраста без патологии в анамнезе); GSE78874 [9] (2016 г., США) — 259 образцов (здоровые индивиды); GSE92767 [21] (2016 г., Южная Корея) — 54 образца (здоровые индивиды); GSE99029 [22] (2017 г., США) — 57 образцов (здоровые индивиды); GSE110128 [23] (2018 г., Бельгия) — 53 образца (33 пациента с аллергическими расстройствами и 20 здоровых индивидов); GSE111223 [9, 24] (2018 г., США) — 259 образцов (128 пациентов с болезнью Паркинсона и 131 здоровый индивид).

Количество здоровых индивидов различного этногеографического происхождения составило 690 человек, с наличием в анамнезе заболеваний острого или хронического характера — 182 человека. Диапазон хронологического возраста включенных в анализ индивидов составил от 1 месяца (для новорожденных) до 91 года. Количество образцов буккального эпителия от мужчин составило 391, от женщин — 299.

Отбор CpG-маркеров для моделирования. В исследовании было принято решение анализировать информацию о CpG-маркерах, потенциал которых для определения хронологического возраста был показан в исследовании Sae Rom Hong et al. [10]: cg18384097 (ген *PTPN7*, protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 7, NCBI Gene ID — 5778), cg00481951 (ген *SST*, somatostatin, NCBI Gene ID — 280932), cg19671120 (ген *CNGA3*, cyclic nucleotide gated channel alpha 3, NCBI Gene ID — 1261), cg14361627 (ген *KLF14*, Kruppel like factor 14, NCBI Gene ID — 136259), cg08928145 (ген *TSSK6*, testis specific serine kinase 6, NCBI Gene ID — 83983), cg12757011 (ген *TBR1*, T-box, brain 1, NCBI Gene ID — 10716), cg07547549 (ген *SLC12A5*, solute carrier family 12 member 5, NCBI Gene ID — 57468).

Статистический анализ данных. Расчет коэффициентов корреляции по Спирману (Spearman rank correlation coefficient) осуществляли с использованием функции бутстрэпа (англ. bootstrap) на количестве 1000 выборок, а также с расчетом 95% доверительного интервала в ПО SPSS v.20.0.

Коэффициент детерминации (R^2), а также скорректированный R^2 , равный доле дисперсии зависимой переменной «Возраст, кол-во лет», обусловленной влиянием независимых

переменных, представляющих собой уровень метилирования CpG-маркеров, рассчитаны с использованием ПО SPSS v.20.0.

Результаты и обсуждение

Как правило, проекты по оценке полногеномного профиля метилирования с использованием ИМ 450K BeadChip ориентированы на когорту людей, представляющих собой своеобразный срез народонаселения конкретной региональной или этнической принадлежности. Таким образом, в подавляющем большинстве научных работ исследователи нацелены на поиск зависимостей между профилем метилирования ДНК и какого-либо заболевания в приложении к задачам в рамках конкретного государства или географического региона. Данный факт позволяет провести в рамках настоящей работы сравнительные исследования и охарактеризовать коэффициенты корреляции с хронологическим возрастом для семи CpG-маркеров — cg18384097 (ген *PTPN7*), cg00481951 (ген *SST*), cg19671120 (ген *CNGA3*), cg14361627 (ген *KLF14*), cg08928145 (ген *TSSK6*), cg12757011 (ген *TBR1*), cg07547549 (ген *SLC12A5*) — в зависимости от половой принадлежности индивидов (мужчины или женщины) и этнорегиональной принадлежности в пределах стран европейского (Великобритания, Бельгия, Германия), северо-американского (США) и восточно-азиатского (Южная Корея) регионов.

Коэффициенты корреляции в рамках независимых GEO-проектов. Коэффициенты корреляции (R) для CpG-маркеров, рассчитанные в рамках проектов NCBI GEO, для которых количество здоровых индивидов было не менее 50 человек — GSE78874 ($n = 259$), GSE92767 ($n = 54$), GSE99029 ($n = 57$), GSE111223 ($n = 131$), — представлены в таблице 1.

Наибольшая разница для рассчитанных значений R была показана для CpG-маркеров: для cg08928145 (ген *TSSK6*) ABS (модуль) — 0,613; для cg00481951 (ген *SST*) — 0,582; для cg14361627 (ген *KLF14*) — 0,513. Минимальная разница для рассчитанных значений R была показана для CpG-маркера cg07547549 (ген *SLC12A5*), ABS — 0,437. Таким образом, наиболее воспроизводимые значения R в рамках независимых GEO-проектов были показаны для CpG-маркеров cg07547549 (ген *SLC12A5*) и cg12757011 (ген *TBR1*).

Таблица 1

Коэффициенты корреляции с хронологическим возрастом для 7 СрG-маркеров, рассчитанные в рамках проектов NCBI GEO, для которых количество здоровых индивидов составило не менее 50 человек

Проект NCBI GEO (кол-во образцов)	R (95% ДИ), p-уровень	СрG-маркеры						
		cg18384097 (PTPN7)	cg00481951 (SST)	cg19671120 (CNGA3)	cg14361627 (KLF14)	cg08928145 (TSSK6)	cg12757011 (TBR1)	cg07547549 (SLC12A5)
8 проектов* (n = 842)	НГ 95%	-0,051	0,710	0,685	0,707	0,619	0,616	0,709
	R	0,031	0,762	0,736	0,754	0,674	0,669	0,759
	ВГ 95%	0,112	0,807	0,783	0,798	0,720	0,712	0,800
	p-уровень	0,442	1,4E-115	6,3E-104	7,6E-112	5,7E-81	1,9E-79	6,4E-114
GSE78874 (n=259)	НГ 95%	-0,102	0,296	0,181	0,243	0,053	0,159	0,248
	R	0,024	0,419	0,308	0,362	0,177	0,292	0,375
	ВГ 95%	0,154	0,536	0,428	0,473	0,295	0,418	0,498
	p-уровень	0,700	3,7E-12	6,1E-07	3,2E-09	0,005	2,4E-06	7,7E-10
GSE92767 (n= 54)	НГ 95%	-0,534	0,805	0,685	0,764	0,525	0,667	0,678
	R	-0,278	0,905	0,813	0,875	0,729	0,796	0,812
	ВГ 95%	0,014	0,956	0,890	0,933	0,862	0,877	0,906
	p-уровень	0,042	5,7E-21	7,7E-14	5,1E-18	4,2E-10	6,1E-13	8,8E-14
GSE99029 (n = 57)	НГ 95%	-0,132	0,515	0,311	0,478	0,151	0,309	0,451
	R	0,163	0,721	0,573	0,717	0,431	0,575	0,693
	ВГ 95%	0,429	0,872	0,756	0,875	0,670	0,756	0,858
	p-уровень	0,226	2,4E-10	3,3E-06	3,5E-10	0,001	2,9E-06	2,3E-09
GSE111223 (n = 131)	НГ 95%	-0,086	0,155	0,158	0,250	-0,055	0,118	0,215
	R	0,102	0,323	0,324	0,408	0,116	0,304	0,384
	ВГ 95%	0,279	0,494	0,486	0,557	0,296	0,471	0,537
	p-уровень	0,266	0,001	0,001	3,4E-06	0,205	0,001	1,4E-05

Примечание. * — GSE110128, GSE111223, GSE59505, GSE72120, GSE72556, GSE78874, GSE92767, GSE99029; НГ 95% — нижняя граница 95% доверительного интервала; ВГ 95% — верхняя граница 95% доверительного интервала

Коэффициенты корреляции с хронологическим возрастом в зависимости от этногеографического происхождения. Коэффициенты корреляции для СрG-маркеров, рассчитанные в рамках проектов NCBI GEO, представлены в таблице 2. В анализе была использована информация только для здоровых индивидов с учетом этногеографического происхождения и без конкретизации половой принадлежности. Количество лиц, относящихся к группе «Корейцы (Korean-Asian)», составило 60 (GSE59505,

Южная Корея, n = 6; GSE92767, Южная Корея n = 54), к группе «Банту/Европейцы (Bantu/European)» — 57 (GSE99029, Великобритания), к группе «Испанцы/Мексиканцы (Hispanic/Mexican)» — 236 (GSE72556, США, n = 96; GSE78874, США, n = 93; GSE111223, США, n = 47), к группе «Европейцы (Caucasian/European)» — 376 (GSE72120, Великобритания, n = 72; GSE39560, Германия, n = 34; GSE110128, Бельгия, n = 20; GSE111223, США, n = 84; GSE78874, США, n = 166).

Таблица 2

Коэффициенты корреляции с хронологическим возрастом для 7 СрG-маркеров, рассчитанные в рамках проектов NCBI GEO, для которых количество здоровых индивидов, принадлежащих к конкретной этнической группе, составляло не менее 50 человек

Проект NCBI GEO (кол-во образцов)	R (95% ДИ), р-уровень	СрG-маркеры						
		cg18384097 (PTPN7)	cg00481951 (SST)	cg19671120 (CNGA3)	cg14361627 (KLF14)	cg08928145 (TSSK6)	cg12757011 (TBR1)	cg07547549 (SLC12A5)
«Caucasian/ European» ¹ (n = 376)	НГ 95%	-0,091	0,320	0,297	0,399	0,124	0,318	0,422
	R	0,039	0,446	0,428	0,510	0,266	0,448	0,539
	ВГ 95%	0,162	0,556	0,536	0,600	0,388	0,553	0,630
	р-уровень	0,531	4,9E-14	6,6E-13	1,8E-18	1,5E-05	3,7E-14	8,1E-21
«Hispanic/ Mexican» ² (n = 236)	НГ 95%	-0,235	0,787	0,751	0,741	0,740	0,639	0,765
	R	-0,101	0,830	0,799	0,792	0,790	0,711	0,813
	ВГ 95%	0,029	0,864	0,834	0,834	0,827	0,768	0,851
	р-уровень	0,129	2,5E-59	7,4E-52	2,7E-50	7,4E-50	2,2E-36	4,7E-55
«Korean- Asian» ³ (n = 60)	НГ 95%	-0,564	0,827	0,452	0,721	0,397	0,329	0,493
	R	-0,335	0,907	0,677	0,842	0,652	0,595	0,701
	ВГ 95%	-0,084	0,949	0,834	0,912	0,812	0,803	0,844
	р-уровень	0,009	1,8E-23	2,8E-09	3,2E-17	1,7E-08	5,3E-07	4,4E-10
«Bantu European» ⁴ (n = 57)	НГ 95%	-0,131	0,501	0,306	0,458	0,146	0,323	0,455
	R	0,163	0,721	0,573	0,717	0,431	0,575	0,693
	ВГ 95%	0,436	0,870	0,763	0,880	0,652	0,758	0,856
	р-уровень	0,226	2,4E-10	3,3E-06	3,5E-10	0,001	2,9E-06	2,3E-09

Примечание. 1 — GSE110128, GSE111223, GSE72120, GSE78874, GSE39560, GSE78874; 2 — GSE111223, GSE72556, GSE78874; 3 — GSE59505, GSE92767; 4 — GSE99029; НГ 95% — нижняя граница 95% доверительного интервала; ВГ 95% — верхняя граница 95% доверительного интервала

Наибольшая разница для рассчитанных значений R была показана для СрG-маркеров: для cg08928145 (ген *TSSK6*) ABS (модуль) — 0,524; для cg00481951 (ген *SST*) — 0,461; для cg19671120 (ген *CNGA3*) — 0,371. Минимальная разница для рассчитанных значений R была показана для СрG-маркера cg12757011 (ген *TBR1*), ABS — 0,263. Таким образом, наиболее воспроизводимые значения R в рамках независимых GEO-проектов были показаны для СрG-маркеров cg07547549 (ген *SLC12A5*) и cg12757011 (ген *TBR1*).

Коэффициенты корреляции с хронологическим возрастом в зависимости от полового фактора. Коэффициенты корреляции для

СрG-маркеров, рассчитанные в рамках проектов NCBI GEO, для которых количество здоровых индивидов каждого пола было не менее 50 человек: для группы «Европейцы (Caucasian/European)» — GSE110128, GSE111223, GSE39560, GSE72120, GSE78874 (M = 180, F = 196); для групп «Испанцы/Мексиканцы (Hispanic/Mexican)» и «Латиноамериканцы (Latino)» — GSE111223, GSE72556, GSE78874 (M = 129, F = 104), — представлены в таблице 3. Общее количество лиц мужского пола (выборка «М») составило 309 человек, женского (выборка «F») — 300 человек.

Наибольшая разница для рассчитанных значений R для выборки «М» была показана для

Таблица 3

Коэффициенты корреляции с хронологическим возрастом для 7 CpG-маркеров, рассчитанные в рамках проектов NCBI GEO, для которых количество здоровых индивидов каждого пола было не менее 50 человек

Этническая группа NCBI GEO (кол-во образцов)	R (95% ДИ), р-уровень	CpG-маркеры						
		cg18384097 (PTPN7)	cg00481951 (SST)	cg19671120 (CNGA3)	cg14361627 (KLF14)	cg08928145 (TSSK6)	cg12757011 (TBR1)	cg07547549 (SLC12A5)
«Caucasian/ European» ¹ (M* = 180)	НГ 95%	-0,104	0,218	0,275	0,288	0,192	0,346	0,461
	R	0,071	0,382	0,434	0,453	0,339	0,502	0,596
	ВГ 95%	0,229	0,539	0,573	0,589	0,479	0,630	0,699
	р-уровень	0,402	2,9E-06	7,5E-08	1,7E-08	4E-05	2,4E-10	6,4E-15
«Caucasian/ European» ² (F** = 196)	НГ 95%	-0,189	0,399	0,189	0,410	-0,021	0,175	0,236
	R	0,008	0,557	0,379	0,562	0,200	0,387	0,426
	ВГ 95%	0,219	0,697	0,557	0,689	0,387	0,567	0,591
	р-уровень	0,929	6,7E-11	2,6E-05	4,2E-11	0,031	1,6E-05	1,6E-06
«Hispanic/ Mexican» ³ (M = 129)	НГ 95%	-0,344	0,758	0,704	0,737	0,683	0,562	0,726
	R	-0,161	0,825	0,786	0,806	0,773	0,682	0,809
	ВГ 95%	0,024	0,874	0,840	0,856	0,828	0,784	0,862
	р-уровень	0,070	7,7E-33	6,7E-28	3,4E-30	2,0E-26	1,0E-18	1,2E-30
«Hispanic/ Mexican» ³ (F = 104)	НГ 95%	-0,236	0,774	0,726	0,691	0,740	0,632	0,740
	R	-0,015	0,844	0,795	0,779	0,803	0,724	0,816
	ВГ 95%	0,188	0,894	0,842	0,844	0,850	0,792	0,863
	р-уровень	0,879	1,6E-28	3,0E-23	9,2E-22	5,6E-24	1,3E-17	2,7E-25

Примечание. 1 – GSE110128, GSE111223, GSE72120, GSE78874; 2 – GSE110128, GSE111223, GSE39560, GSE72120, GSE78874; 3 – GSE111223, GSE72556, GSE78874; 4 – GSE59505, GSE92767; * – мужчины; ** – женщины; НГ 95% – нижняя граница 95% доверительного интервала; ВГ 95% – верхняя граница 95% доверительного интервала

CpG-маркеров: cg00481951 (ген *SST*) ABS (модуль) — 0,525; cg08928145 (ген *TSSK6*) — 0,434; cg14361627 (ген *KLF14*) — 0,389. Наибольшая разница для рассчитанных значений R для выборки «F» была показана для CpG-маркеров: cg08928145 (ген *TSSK6*) ABS (модуль) — 0,540; cg19671120 (ген *CNGA3*) — 0,347; cg07547549 (ген *SLC12A5*) — 0,314. Минимальная разница для рассчитанных значений R как для двух выборок («M» и «F») была показана для CpG-маркера cg19671120 (ген *CNGA3*), ABS — 0,005, cg12757011 (ген *TBR1*) — 0,065 и cg07547549 (ген *SLC12A5*) — 0,101.

Расчет коэффициентов детерминации (R^2) для 7 CpG-маркеров. На основании данных по

уровню метилирования 7 CpG-маркеров нами были рассчитаны скорректированные коэффициенты детерминации для множественной линейной регрессии как для отдельных проектов GEO (согласно табл. 1), так и в контексте этно-географического статуса (согласно табл. 2). Исходя из данных, представленных на рисунке 1, видно, что если значения среднего возраста в выборке оказывались смещенными в более возрастной (>60 лет) диапазон (например, для проектов GSE78874 или GSE111223), то скорректированный R^2 был меньше. Как известно, регрессионная модель способна адекватно (с рассчитанным уровнем точности) предсказывать зависимую переменную (хронологический

возраст) при моделировании только в анализируемом диапазоне значений, поэтому расширение возрастных рамок для зависимой переменной способно стабилизировать модель.

При объединении нескольких GEO-проектов в группы в зависимости от принадлежности индивидов к определенной этнической группе, было показано, что коэффициенты детерминации (R^2) варьировали в диапазоне 0,759–0,945 (рис. 2).

Для каждой группы индивидов в контексте этнической принадлежности были рассчитаны уравнения множественной линейной регрессии. На рисунке 3 для каждой этнической группы показаны скорректированные предсказанные значения хронологического возраста, рассчитанные на основании уровня метилирования 7 CpG-маркеров. При включении в уравнение регрессии факторной переменной «Пол» точность предсказания хронологиче-

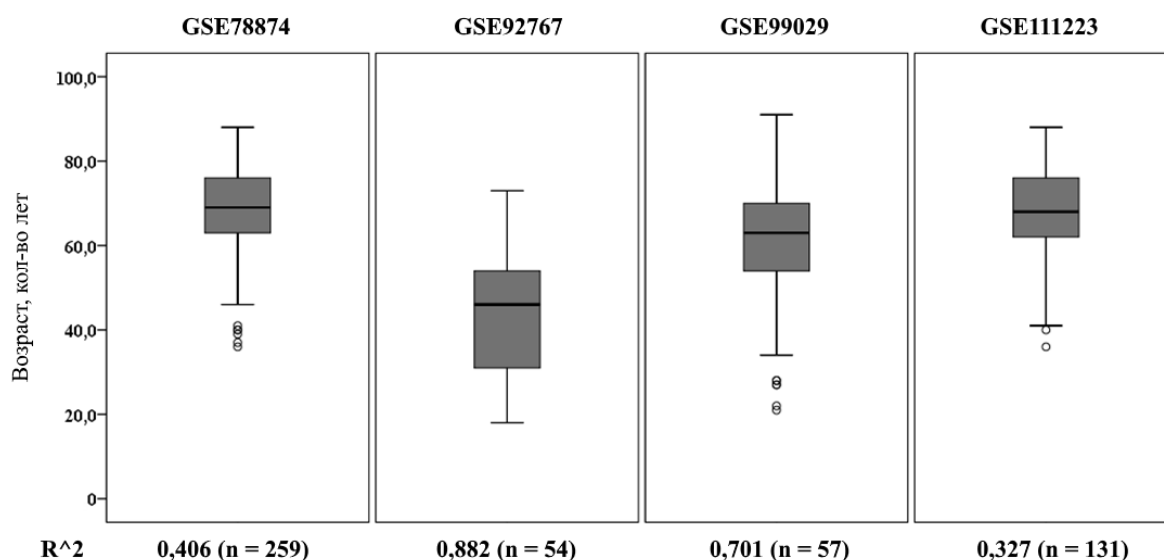


Рис. 1. Характеристика анализируемых GEO-проектов по возрасту включенных в исследование резидентов (для проектов из табл. 1). Внизу приведены значения скорректированных коэффициентов детерминации R^2 для хронологического возраста, рассчитанные по данным 7 CpG-маркеров

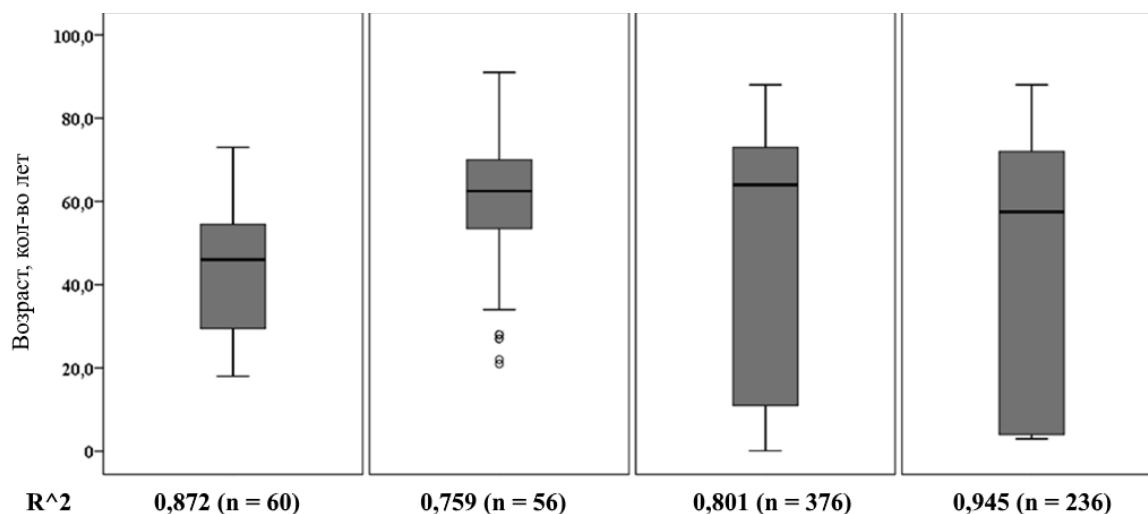


Рис. 2. Характеристика анализируемых GEO-проектов по возрасту включенных в исследование индивидов (для проектов из табл. 2). Внизу приведены значения скорректированных коэффициентов детерминации R^2 для хронологического возраста, рассчитанные по данным 7 CpG-маркеров

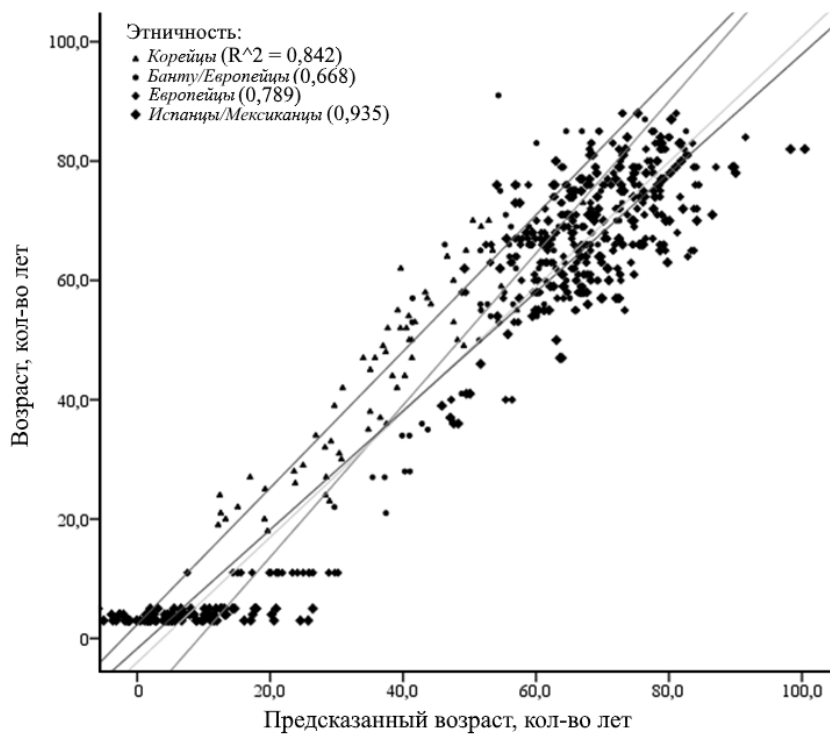


Рис. 3. Регрессионная модель для предсказания хронологического возраста по уровню метилирования CpG-маркеров

ского возраста возрастает, но незначительно. В зависимости от этнической принадлежности индивидов включение в анализ переменной «Пол» способно повысить точность модели на 0,4–4,6%.

В рамках совокупного анализа по данным GEO-проектов по влиянию на изменение коэффициента детерминации (R^2) CpG-маркеры расположились в следующей последовательности: cg00481951 ($R^2=0,776$), cg14361627 (+0,047 к предыдущему значению R^2), cg18384097 (+0,035), cg19671120 (0,029), cg07547549 (0,005), cg12757011 (0,001), cg08928145 (0,001). Для индивидов из группы «Европейцы (Caucasian/European)» CpG-маркеры расположились в следующей последовательности (показаны только значимые изменения R^2): cg07547549 ($R^2=0,579$), cg00481951 (+0,131), cg18384097 (+0,039), cg14361627 (+0,043), cg19671120 (0,011), cg12757011 (0,004); для индивидов из группы «Испанцы/Мексиканцы (Hispanic/Mexican)»: cg00481951 ($R^2=0,887$), cg14361627 (+0,037), cg19671120 (+0,007), cg18384097 (+0,012), cg07547549 (+0,003); для группы «Банту/Европейцы (Bantu/European)»: cg14361627 ($R^2=0,727$), cg00481951 (+0,036), cg19671120 (0,020).

В целом, помимо информации об уровне метилирования CpG-маркеров, наличие дополнительных данных (пол, этническая принадлежность, наличие хронических заболеваний, наличие вредных привычек), которые могут быть включены в уравнение регрессионной модели, способно повысить точность предсказания хронологического возраста. Привлечение результатов GEO-проектов и расширение базы данных, на которых строится модель, также способно увеличить точность анализа.

Заключение

На основании данных, представленных в открытом доступе на платформе GEO-NCBI для 8 проектов по определению полногеномного профиля метилирования ДНК с использованием Infinium Human Methylation 450K BeadChip (Illumina®) — GSE59505, GSE72120, GSE72556, GSE78874, GSE92767, GSE99029, GSE110128, GSE111223, — для 690 индивидов без наличия хронических и острых заболеваний в анамнезе рассчитаны коэффициенты корреляции в отношении возраста для 7 CpG-маркеров cg18384097 (ген *PTPN7*), cg00481951 (ген *SST*), cg19671120 (ген *CNGA3*),

cg14361627 (ген *KLF14*), cg08928145 (ген *TSSK6*), cg12757011 (ген *TBR1*), cg07547549 (ген *SLC12A5*), а также коэффициенты детерминации для сравнения и характеристики уравнений многомерной линейной регрессии.

Нами показано, что для индивидов без наличия хронических или острых заболеваний в анамнезе, в независимости от этногеографического и полового факторов, наибольшим предсказательным потенциалом для определения хронологического возраста обладают CpG-маркеры cg00481951 (ген *SST*) и cg14361627 (ген *KLF14*), при совокупном анализе на них приходится 62,9–74,5% и 62,7–73,8% дисперсии переменной «Возраст, кол-во лет» соответственно. При анализе же всех 7 CpG-маркеров объясненная в рамках регрессионной модели дисперсия переменной «Возраст, кол-во лет» варьирует в пределах 75,9–94,5%.

Таким образом, схема определения хронологического возраста посредством определения профиля метилирования по 7 CpG-маркерам отличается универсальностью, т. е. вне зависимости от этногеографического статуса неизвестного человека или его половой принадлежности имеется возможность дать криминалистам достаточно точную (ограниченную точностью используемой для анализа модели) информацию о предположительном возрасте индивида или о том, к какой возрастной группе его отнести.

В целом, с целью увеличения точности предсказания хронологического возраста по профилю метилирования CpG-маркеров для неустановленного лица из конкретного географического региона или с учетом этнической, национальной или половой составляющей, а также с учетом информации о наличии хронических или острых заболеваний может быть показано использование дополнительных специфических CpG-маркеров.

Список использованных источников

1. Goel, N. Role of DNA methylation in human age prediction / N. Goel, P. Karir, V.K. Garg // *Mechanisms of Ageing and Development*. – 2017. – Vol. 166. – P. 33–41. doi: 10.1016/j.mad.2017.08.012.
2. Hannum, G. Genome-wide methylation profiles reveal quantitative views of human ag-

ing rates / G. Hannum [et al.] // *Molecular Cell*. – 2013. – Vol. 24. – P. 359–367. doi: 10.1016/j.molcel.2012.10.016.

3. Alghanim, H. Detection and evaluation of DNA methylation markers found at SCGN and KLF14 loci to estimate human age / H. Alghanim [et al.] // *Forensic Science International: Genetics*. – 2017. – Vol. 31. – P. 81–88. doi: 10.1016/j.fsigen.2017.07.011.

4. Alsaleh, H. A multi-tissue age prediction model based on DNA methylation analysis / H. Alsaleh [et al.] // *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*. – 2017. – Vol. 6. – P. 62–64. doi: 10.1016/j.fsigss.2017.09.056.

5. Bocklandt, S. Epigenetic predictor of age / S. Bocklandt [et al.] // *PLoS One*. – 2011. – Vol. 6. – P. e1–e6. doi: 10.1371/journal.pone.0014821.

6. Horvath, S. DNA methylation age of human tissues and cell types / S. Horvath // *Genome Biology*. – 2013. – Vol. 14. – P. e1–e19. doi: 10.1186/gb-2013-14-10-r115.

7. Horvath, S. Obesity accelerates epigenetic aging of human liver / S. Horvath [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America)*. – 2014. – Vol. 28. – P. 15538–15543. doi: 10.1073/pnas.1412759111.

8. Horvath, S. Accelerated epigenetic aging in Down syndrome / S. Horvath [et al.] // *Aging Cell*. – 2015. – Vol. 14(3). – P. 491–495. doi: 10.1111/accel.12325.

9. Horvath, S. Increased epigenetic age and granulocyte counts in the blood of Parkinson's disease patients / S. Horvath, B. Ritz // *Aging (Albany NY)*. – 2015. – Vol. 7(12). – P. 1130–1142. doi: 10.18632/aging.100859.

10. Koch, C. M. Epigenetic-aging-signature to determine age in different tissues / C. M. Koch, W. Wagner // *Aging (Albany NY)*. – 2011. – Vol. 3. – P. 1018–1027. doi: 10.18632/aging.100395.

11. Lee, H. Y. Forensic DNA methylation profiling from evidence material for investigative leads / H. Y. Lee, S. D. Lee, K. J. Shin // *BMB Reports*. – 2016. – Vol. 49. – P. 359–369. doi: 10.5483/bmbrep.2016.49.7.070.

12. Park, J. L. Identification and evaluation of age-correlated DNA methylation markers for forensic use / J. L. Park [et al.] // *Forensic Sci-*

- ence International: Genetics. – 2016. – Vol. 23. – P. 64–70. doi: 10.1016/j.fsigen.2016.03.005.
13. Rana, A. K. Crime investigation through DNA methylation analysis: methods and applications in forensics / A. K. Rana // *Egyptian Journal of Forensic Sciences*. – 2018. – Vol. 8. – P. e1–e17. doi: 10.1186/s41935-018-0042-1.
14. Sparrow, S. Epigenomic profiling of pre-term infants reveals DNA methylation differences at sites associated with neural function / S. Sparrow [et al.] // *Translational Psychiatry*. – 2016. – Vol. 19. – P. e1–e8. doi: 10.1038/tp.2015.210.
15. Zbiec-Piekarska, R. Development of a forensically useful age prediction method based on DNA methylation analysis / R. Zbiec-Piekarska [et al.] // *Forensic Science International: Genetics*. – 2015. – Vol. 17. – P. 173–179. doi: 10.1016/j.fsigen.2015.05.001.
16. Fleckhaus, J. Impact of genetic ancestry on chronological age prediction using DNA methylation analysis / J. Fleckhaus [et al.] // *Forensic Science International: Genetics. Supplement Series*. – 2017. – Vol. 6. – P. e399–e400. doi: 10.1016/j.fsigss.2017.09.162.
17. Freire-Aradas, A. Development of a methylation marker set for forensic age estimation using analysis of public methylation data and the Agena Bioscience EpiTYPER system / A. Freire-Aradas [et al.] // *Forensic Science International: Genetics*. – 2016. – Vol. 24. – P. 65–74. doi: 10.1016/j.fsigen.2016.06.005.
18. Smeers, I. Evaluation of three statistical prediction models for forensic age prediction based on DNA methylation / I. Smeers [et al.] // *Forensic Science International: Genetics*. – 2018. – Vol. 34. – P. 128–133. doi: 10.1016/j.fsigen.2018.02.008.
19. Zbiec-Piekarska, R. Examination of DNA methylation status of the ELOVL2 marker may be useful for human age prediction in forensic science / R. Zbiec-Piekarska [et al.] // *Forensic Science International: Genetics*. – 2015. – Vol. 14. – P. 161–167. doi: 10.1016/j.fsigen.2014.10.002.
20. Vidaki, A. DNA methylation-based forensic age prediction using artificial neural networks and next generation sequencing / A. Vidaki [et al.] // *Forensic Science International: Genetics*. – 2017. – Vol. 28. – P. 225–236. doi: 10.1016/j.fsigen.2017.02.009.
21. Hong, S. R. DNA methylation-based age prediction from saliva: High age predictability by combination of 7 CpG markers / S. R. Hong [et al.] // *Forensic Science International: Genetics*. – 2017. – Vol. 29. – P. 118–125. doi: 10.1016/j.fsigen.2017.04.006.
22. Gopalan, S. Trends in DNA Methylation with Age Replicate Across Diverse Human Populations / S. Gopalan [et al.] // *Genetics*. – 2017. – Vol. 206. – P. 1659–1674. doi: 10.1534/genetics.116.195594.
23. Lee, H. Y. Genome-wide methylation profiling and a multiplex construction for the identification of body fluids using epigenetic markers / H. Y. Lee [et al.] // *Forensic Science International: Genetics*. – 2015. – Vol. 17. – P. 17–24. doi: 10.1016/j.fsigen.2015.03.002.
24. Chuang, Y. H. Parkinson's disease is associated with DNA methylation levels in human blood and saliva / Y. H. Chuang [et al.] // *Genome Medicine*. – 2017. – Vol. 9. – P. e1–e12. doi: 10.1186/s13073-017-0466-5.

V. N. Kipen¹, M. V. Bahdanava¹, A. A. Burakova¹, O. V. Zotova^{1,2}, O. I. Dobysh¹, T. S. Koroleva²,
A. V. Baida³, A. G. Bulgak², S. A. Bruskin⁴, V. A. Lemesh¹

PREDICTIVE POTENTIAL OF CpG MARKERS IN THE DETERMINATION OF CHRONOLOGICAL HUMAN AGE

¹State Scientific Institution

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

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

e-mail: V.Lemesh@igc.by

²State Institution

“Republican Scientific and Practical Centre “CARDIOLOGY” of the Ministry of Health of the Republic of Belarus”

110B, Rosa Lyuksemburg St., 220089 Minsk, the Republic of Belarus

³State Educational Establishment

“Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education”

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

⁴Federal State Budgetary Institution of Science

“N.I. Vavilov Institute of General Genetic of the Russian Academy of Sciences”

3, Gubkina St., 117791 Moscow, the Russian Federation

Based on the publicly available data on the GEO-NCBI platform for 8 projects on identifying the genome-wide DNA methylation profile using the Infinium Human Methylation 450K BeadChip (Illumina®), the correlation coefficients in relation to age were calculated for 7 CpG markers — cg18384097 (*PTPN7* gene), cg00481951 (*SST* gene), cg19671120 (*CNGA3* gene), cg14361627 (*KLF14* gene), cg08928145 (*TSSK6* gene), cg12757011 (*TBR1* gene), cg07547549 (*SLC12A5* gene) — for 690 individuals with no history of any acute or chronic diseases. The CpG markers cg00481951 (*SST* gene) and cg14361627 (*KLF14* gene) have the highest predictive potential for determining of chronological age. In the aggregated analysis, they account for 62.9–74.5% and 62.7–73.8% of the variance of the variable “Age, the number of years” respectively. When analyzing all 7 CpG markers, the variance of the variable “Age, the number of years” explained within the framework of the regression model varies within 75.9–94.5%.

Keywords: DNA methylation, buccal epithelium, age determination, HumanMethylation450 BeadChip, forensic epigenetics.

Дата поступления статьи: 24 марта 2020 г.

Н. Г. Седляр, И. Б. Моссэ, Л. А. Кундас, А. Л. Гончар, М. Д. Амелянович

ОЦЕНКА РИСКА НЕВЫНАШИВАНИЯ БЕРЕМЕННОСТИ НА ОСНОВЕ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОГО АНАЛИЗА

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

Исследована ассоциация 31 полиморфного варианта генов систем гемостаза, регуляции артериального давления, ангиогенеза и фолатного цикла с невынашиванием беременности. В исследовании приняло участие 2938 женщин с невыясненными причинами невынашивания беременности и 646 женщин без патологий беременности. Определены частоты генотипов изученных полиморфных вариантов генов, проведено сравнение частот аллельных вариантов между группой пациенток и контрольной группой. В ходе поиска комбинаций генов риска выявлено 11 комплексов генов, ассоциированных с невынашиванием беременности, которые позволяют оценить уровень риска и дадут возможность врачам назначить соответствующую терапию, в результате которой беременность сохранится вплоть до успешных родов, что имеет огромное и социальное, и экономическое значение, а также позволит улучшить демографическую ситуацию в стране.

Ключевые слова: невынашивание беременности, генетическое тестирование, ПЦР, ангиогенез, фолатный цикл, гемостаз, оценка риска, профилактика.

Введение

Известно, что наличие генетической предрасположенности к невынашиванию беременности сопряжено с нарушениями в системе фибринолиза, что часто приводит к нарушению процесса прикрепления плода и, как следствие, раннему прерыванию беременности [1]. Генетические нарушения системы гемостаза часто проявляются только при дополнительных условиях, одним из которых является беременность. При этом обычная коагулограмма дает результаты без отклонений, но при развитии беременности проявляются генетически заложенные свойства организма — образуются микротромбы в плаценте, и беременность прерывается.

На сегодняшний день существует большое количество данных, подтверждающих роль полиморфизма тромбофилических факторов в развитии гестационных осложнений, в том числе и невынашивания [1, 2]. В то же время полиморфизм генов других генетических систем (гены системы регуляции артериального давления, ангиогенеза, фолатного цикла) может не принимать непосредственного участия в патогенезе привычного невынашивания беременности, однако оказывать косвенное, хотя и не менее значи-

мое, влияние на предрасположенность к формированию патологического симптомокомплекса. В связи с этим целесообразность исследования генов различных систем, ассоциированных с процессами беременности, у женщин с привычными выкидышами является несомненно актуальной, поскольку выявление высокого генетического риска потери беременности позволяет врачам назначать соответствующую терапию, в результате которой беременность сохраняется вплоть до успешных родов.

Большое значение в формировании генетического риска потери беременности имеет не только носительство отдельных аллелей риска, но и их взаимодействие друг с другом. В связи с этим совершенно очевидна необходимость исследований комплексов генов, которые могут расширить представления о вкладе генетического полиморфизма в патогенез беременности. Это обеспечит новый подход к диагностике данной патологии, более корректное определение уровня генетического риска репродуктивных потерь, а также эффективную профилактику патологии и соответствующее ведение беременности у женщин с высоким генетическим риском потери беременности.

Материалы и методы

В ходе анализа опубликованных результатов исследований зарубежных и отечественных авторов были отобраны гены-кандидаты, ассоциированные с процессами развития беременности. К ним относятся гены белков системы гемостаза, тромбоцитарных рецепторов, белков, вовлеченных в патогенез эндотелиальной дисфункции, а также белков, принимающих участие в регуляции артериального давления и ростовых факторов. Особое внимание уделено

информации о полиморфизмах генов коагуляционного каскада.

Нами отобраны наиболее информативные полиморфные варианты генов в количестве 31 шт. (гены системы гемостаза, системы регуляции артериального давления, системы ангиогенеза, системы фолатного цикла), которые могут использоваться в качестве маркеров предрасположенности к невынашиванию беременности, составлена панель генов (табл. 1).

Таблица 1

Панель генов для тестирования генетического риска невынашивания беременности

№ пп.	Название гена	Полиморфный вариант	Полное название гена	rs	Источник
Гены системы гемостаза					
1	<i>FI</i>	Thr312Ala	ген α-цепи фибриногена I фактора свертывания крови	6050	[3–5]
2	<i>FII</i>	G20210A	мутация G20210A гена II фактора свертывания крови (протромбина)	1799963	[6, 7]
3	<i>FV</i>	G1691A	мутация гена V фактора свертывания крови (Лейденская мутация)	6025	
4	<i>FXIII</i>	Val34Leu	ген XIII фактора свертывания крови	5985	[8, 9]
5	<i>FXI</i>	C/T	ген XI фактора свертывания крови	2289252	[10, 11]
6	<i>FXI</i>	T/C		2036914	
7	<i>FGG</i>	C10034T	ген гамма-цепи фибриногена	2066865	[12, 13]
8	<i>ITGA2 (GPIa)</i>	C807T	ген белка интегрин альфа-2	1126643	[14]
9	<i>ITGB3 (GpIIIa)</i>	T1565C (L33P)	ген белка интегрин бета-3	5918	[15]
10	<i>Gp6</i>	G/T	ген рецептора гликопротеина VI	1671153	[16, 17]
11	<i>Gp6</i>	A/G		1654419	
12	<i>Gp6</i>	A/G		1613662	
13	<i>GPIBA</i>	C/T	ген тромбоцитарного гликопротеина Ib	2243093	[18, 19]
Гены системы регуляции артериального давления					
14	<i>ACE</i>	Alu Ins/Del	ген ангиотензин-превращающего фермента	4646994	[20, 21]
15	<i>eNOS</i>	4a/4b	ген эндотелиальной синтазы окиси азота	61722009	[22, 23]
16	<i>eNOS</i>	G894T		1799983	[24]
17	<i>PPARG</i>	Pro12Ala	ген гамма-рецептора, активируемого пролифератором пероксисом	1801282	[25, 26]
18	<i>PPARGC1A</i>	G1564A	ген коактиватора ядерных рецепторов генов семейства PPAR	8192678	[26, 27]
19	<i>PPARD</i>	+294T/C	ген ядерных рецепторов типа дельта, активирующих пролиферацию пероксисом	2016520	[26, 28]
20	<i>PPARA</i>	G2528C		4253778	[26]

Продолжение таблицы 1

№ пп.	Название гена	Полиморфный вариант	Полное название гена	rs	Источник
21	<i>AGTR1</i>	A1166C	ген сосудистого рецептора I типа ангиотензина-2	5186	[29, 30]
22	<i>BDKRB2</i>	I/D	ген рецептора брадикинина $\beta 2$	5810761	[31]
23	<i>APOE</i>	Cys112Arg + Arg158Cys	ген аполипопротеина E	429358 + 7412	[32–34]
Гены системы ангиогенеза					
24	<i>PAI-1</i>	4G/5G	ген ингибитора активатора плазминогена	1799889	[21]
25	<i>VEGF</i>	G634C	ген фактора роста эндотелия сосудов	2010963	[35]
26	<i>HIF1A</i>	C1772T	ген фактора, индуцируемого гипоксией	11549465	[36]
27	<i>EPO</i>	G3876T	ген рецептора эритропоэтина	1617640	[37]
28	<i>CYBA</i>	C/T	ген цитохрома b	4673	[38]
Гены системы фолатного цикла					
29	<i>MTHFR</i>	C677T	ген метилентетрагидрофолатредуктазы	1801133	[39, 40]
30	<i>MTHFR</i>	A1298C		1801131	
31	<i>MTR</i>	A2756G	ген метионинсинтазы	1805087	[40, 41]

Проведено генотипирование 2938 женщин с невыясненными причинами невынашивания беременности (2 и более потерянные беременности, нет детей), которые составили группу пациенток, и 646 женщин без патологий беременности, имеющих не менее двух благополучно выношенных и рожденных детей, — группа контроля. От каждого человека получено информированное добровольное согласие на участие в исследовании.

В качестве биологического материала для исследования использовали ДНК, выделенную из клеток буккального эпителия или лейкоцитов периферической крови. Концентрацию образцов ДНК измеряли с помощью флуориметра Qubit (Invitrogen, USA).

Для идентификации полиморфных вариантов использовалась амплификация специфических последовательностей ДНК методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени или с разделением продуктов в полиакриламидном геле.

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью F-критерия Фишера в среде R. Оценку влияния полиморфных вариантов на риск развития заболевания проводили с помощью отношения шансов (OR). Результаты анализа считали статистически

значимыми при уровне $p < 0,05$. Характер распределения наблюдаемых частот генотипов в популяции оценивали на соответствие уравнению Харди-Вайнберга.

При сравнении количества факторов риска невынашивания беременности в генотипах пациенток и в генотипах женщин контрольной группы проводилась проверка нулевой гипотезы с помощью теста Манна-Уитни для независимых выборок.

Для поиска комплексов генов, связанных с развитием невынашивания беременности, были проанализированы все возможные комбинации из 31 гена по парам, триплетам и квартетам (табл. 2).

При этом 30 генов из 31 отобранных были представлены максимум тремя аллельными вариантами, а один (*APOE* Cys112Arg + Arg158Cys) — девятью вариантами. В сумме выявлено 99 аллельных вариантов генов, комбинации между которыми следует проанализировать по парам, триплетам и квартетам (табл. 3).

С целью автоматизации процесса поиска комплексов была разработана специальная компьютерная программа, которая позволила значительно сократить время на поиск сочетаний факторов риска. Программа составляла

комбинации из двух, трех и четырех генов, для каждой из которых подбирались все возможные аллельные варианты. Затем для каждой аллельной комбинации подсчитывались частоты ее встречаемости в контрольной группе и в группе пациенток. Пример такой таблицы со случайными данными представлен ниже (табл. 4).

Для каждой аллельной комбинации строилась таблица 2х2, где в первой строке частоты встречаемости данной комбинации в группе

пациенток и в контрольной группе, а во второй строке — сумма частот встречаемости остальных комбинаций в этих же группах (табл. 5).

Построенная таблица 2х2 анализировалась с помощью F-критерия Фишера, рассчитывалось значение p и OR. Предварительно исключались из анализа те аллельные комбинации, которые состояли из аллельных вариантов, не ассоциированных с риском невынашивания беременности. Аналогичным образом проводился поиск комплексов из трех и четырех генов.

Таблица 2

Количество возможных комбинаций 2–4 из 31 гена в зависимости от размерности модели

Размерность модели, предикторов	Количество возможных комбинаций, штук
2	465
3	4495
4	31 465

Таблица 3

Количество возможных комбинаций 2–4 из 99 аллельных вариантов генов в зависимости от размерности модели

Размерность модели, предикторов	Количество возможных комбинаций, штук
2	4851
3	156 849
4	3 764 376

Таблица 4

Пример построения таблицы со всеми возможными аллельными комбинациями для пары генов *ACE* + *F5*

<i>ACE</i>	<i>F5</i>	Частота встречаемости, раз	
Аллельная комбинация		Пациентки	Контрольная группа
<i>II</i> + <i>GG</i>		5	23
<i>II</i> + <i>GA</i>		0	0
<i>II</i> + <i>AA</i>		0	0
<i>ID</i> + <i>GG</i>		12	3
<i>ID</i> + <i>GA</i>		4	1
<i>ID</i> + <i>AA</i>		0	0
<i>DD</i> + <i>GG</i>		8	5
<i>DD</i> + <i>GA</i>		3	0
<i>DD</i> + <i>AA</i>		0	0
Сумма		32	32

Таблица 5

Пример построения таблицы 2x2 для аллельной комбинации *II + GG* генной комбинации *ACE + F5*

Аллельная комбинация	Аллельные варианты	
	Пациентки	Контрольная группа
<i>II + GG</i>	5	23
Другие комбинации	27	9

Результаты и обсуждение

Проведено генотипирование отобранных образцов ДНК в группе пациенток и контрольной группе согласно разработанной панели генов. Определены частоты генотипов изученных полиморфных вариантов генов, проведено сравнение частот аллельных вариантов между группой пациенток и контрольной группой.

При анализе частот генов системы гемостаза выявлено статистически значимое превышение частот лишь двух полиморфизмов из 13 проанализированных в группе пациенток по сравнению с контрольной группой (табл. 6). По нашим данным наличие аллельного варианта *T/C* полиморфного варианта *T/C* (rs5918) гена *ITGB3* в генотипе статистически значимо ($p = 0,031$) увеличивает риск невынашивания беременности в 1,7 раз ($OR = 1,7$; 95% $CI = 1,03–2,82$). Понятно, что и гомозигота *C/C* также является фактором риска, хотя данные и недостоверны из-за малых значений частот этого минорного аллеля.

Также обращает на себя внимание факт повышенных (хотя статистически и недостоверных) частот аллельных вариантов *T/T* гена *ITGA2* *C/T*, *C/C* гена *ITGB3* *T/C* и *T/T* гена *FII* *T/C* в генотипах пациенток по сравнению с контрольной группой.

Аналогичные результаты получены и при сравнении частот полиморфизмов генов системы ангиогенеза в исследуемых группах — было выявлено статистически значимое превышение частот лишь одного полиморфизма из 5 проанализированных (табл. 7).

Среди генов системы ангиогенеза можно также выделить полиморфные варианты *EPO* G3876T и *CYBA* *C/T* (rs4673), аллельные варианты которых с участием минорных аллелей (*G/T + T/T* и *C/T + T/T* соответственно) преобладают в генотипах пациенток по срав-

нению с контрольной группой. Распределение частот аллельных вариантов *G/T + T/T* (*EPO* G3876T) статистически значимо отличается в группе пациентов по сравнению с контрольной группой ($p = 0,034$; $OR = 1,82$; 95% $CI = 1,03–3,27$). Тем не менее не удалось достигнуть требуемого уровня значимости в распределении частот аллельных вариантов полиморфизма *CYBA* *C/T*, аллелей обоих полиморфных вариантов — *G* и *T* ($p = 0,085$), *C* и *T* ($p = 0,1058$).

При сравнении частот аллельных вариантов генов системы метаболизма фолатного цикла в группе пациенток и в контрольной группе статистически значимые различия выявлены не были, несмотря на достаточно большие объемы исследованных выборок (табл. 8).

При сравнении частот аллельных вариантов генов системы артериального давления в исследуемых группах не было выявлено статистически значимых превышений частот 10 полиморфизмов, проанализированных в группе пациенток по сравнению с контрольной группой (табл. 9). Однако были выявлены гены, частоты аллельных вариантов которых в генотипах пациенток превышают (хотя и не достоверно) таковые в контрольной группе — это *4a/4a* гена *eNOS* *4a/4b* и все аллельные сочетания с участием минорных аллелей гена *APOE* Cys112Arg + Arg158Cys.

В ходе дополнительно проведенного анализа распределения частот аллелей *E4*, *E3* и *E2* полиморфизма Cys112Arg + Arg158Cys гена *APOE* удалось выявить статистически значимые различия — аллели *E4 + E2* встречались значимо чаще в группе пациенток по сравнению с контрольной группой ($p = 0,0146$), а их наличие в генотипе женщин, согласно полученным данным, может увеличивать риск невынашивания беременности в 1,25 раз ($OR = 1,25$; 95% $CI = 1,05–1,51$).

Таблица 6

Частоты полиморфизмов генов системы гемостаза в группе пациенток и контрольной группе

№ пп.	Ген, полиморфный вариант	Аллельный вариант	Частота		p
			Пациентки, n1	Контрольная группа, n2	
1	<i>F1</i> Thr312Ala n1 = 2457 n2 = 510	<i>Thr/Thr</i>	55,39	54,90	0,85
		<i>Thr/Ala</i>	37,65	38,04	0,88
		<i>Ala/Ala</i>	6,96	7,06	0,92
2	<i>F2</i> G20210A n1 = 2938, n2 = 646	<i>G/G</i>	98,13	98,30	0,87
		<i>G/A</i>	1,87	1,70	0,87
3	<i>F5</i> Arg506Gln n1 = 2938, n2 = 646	<i>G/G</i>	97,45	94,89	0,001
		<i>G/A</i>	2,55	5,11	0,001
4	<i>F13</i> Val34Leu n1 = 2897 n2 = 613	<i>Val/Val</i>	47,81	49,76	0,40
		<i>Val/Leu</i>	43,36	41,44	0,39
		<i>Leu/Leu</i>	8,84	8,81	1,00
5	<i>FGG</i> C/T rs2066865 n1 = 157 n2 = 177	<i>C/C</i>	60,51	58,19	0,74
		<i>C/T</i>	33,12	34,46	0,82
		<i>T/T</i>	6,37	7,34	0,83
6	<i>ITGA2</i> C/T rs1126643 n1 = 157 n2 = 179	<i>C/C</i>	31,85	35,75	0,49
		<i>C/T</i>	52,23	54,75	0,66
		<i>T/T</i>	15,92	9,50	0,10
7	<i>Gp6</i> A/G rs1613662 n1 = 157 n2 = 179	<i>A/A</i>	76,43	78,77	0,69
		<i>A/G</i>	21,66	18,99	0,59
		<i>G/G</i>	1,91	2,23	1,00
8	<i>Gp6</i> A/G rs1654419 n1 = 157 n2 = 178	<i>A/A</i>	3,18	2,81	1,00
		<i>A/G</i>	26,11	23,60	0,61
		<i>G/G</i>	70,70	73,60	0,63
9	<i>Gp6</i> G/T rs1671153 n1 = 157 n2 = 179	<i>T/T</i>	70,70	74,86	0,46
		<i>G/T</i>	26,75	22,35	0,37
		<i>G/G</i>	2,55	2,79	1,00
10	<i>ITGB3</i> T/C rs5918 n1 = 157 n2 = 179	<i>T/T</i>	62,42	74,86	0,02
		<i>T/C</i>	35,03	24,02	0,03
		<i>C/C</i>	2,55	1,12	0,42
11	<i>F11</i> T/C rs2036914 n1 = 157 n2 = 179	<i>T/T</i>	22,93	20,11	0,59
		<i>T/C</i>	46,50	50,84	0,45
		<i>C/C</i>	30,57	29,05	0,81
12	<i>F11</i> C/T rs2289252 n1 = 157 n2 = 179	<i>C/C</i>	43,31	31,84	0,03
		<i>C/T</i>	39,49	55,87	0,003
		<i>T/T</i>	17,20	12,29	0,22
13	<i>GPIBA</i> C/T rs2243093 n1 = 157 n2 = 179	<i>C/C</i>	0,00	1,12	0,50
		<i>C/T</i>	24,20	16,76	0,10
		<i>T/T</i>	75,80	82,12	0,18

Таблица 7

Частоты полиморфизмов генов системы ангиогенеза в группе пациенток и контрольной группе

№ пп.	Ген, полиморфный вариант	Аллельный вариант	Частота		p
			Пациентки, n1	Контрольная группа, n2	
14	<i>PAI-1</i> 4G/5G n1 = 2928 n2 = 638	5G/5G	17,93	20,06	0,21
		5G/4G	48,94	48,12	0,73
		4G/4G	33,13	31,82	0,55
15	<i>VEGF</i> G-634C n1 = 1389 n2 = 394	G/G	56,95	51,02	0,04
		G/C	36,57	41,62	0,08
		C/C	6,48	7,36	0,57
16	<i>HIF1A</i> C1772T n1 = 1378 n2 = 386	C/C	86,72	86,53	0,93
		C/T	12,99	12,69	0,93
		T/T	0,29	0,78	0,18
17	<i>EPO</i> G3876T n1 = 166 n2 = 204	G/G	14,46	23,53	0,03
		G/T	48,19	43,14	0,35
		T/T	37,35	33,33	0,45
18	<i>CYBA</i> C/T rs4673 n1 = 157 n2 = 179	C/C	36,31	45,25	0,12
		C/T	50,32	44,69	0,33
		T/T	13,38	10,06	0,40

Таблица 8

Частоты полиморфизмов генов системы фолатного цикла в группе пациенток и контрольной группе

№ пп.	Ген, полиморфный вариант	Аллельный вариант	Частота		p
			Пациентки, n1	Контрольная группа, n2	
19	<i>MTHFR</i> A1298C n1 = 2952 n2 = 633	A/A	47,05	43,44	0,10
		A/C	42,75	44,39	0,45
		C/C	10,2	12,16	0,15
20	<i>MTHFR</i> C677T n1 = 2952 n2 = 633	C/C	47,97	50,71	0,22
		C/T	42,11	41,23	0,69
		T/T	9,93	8,06	0,16
21	<i>MTR</i> A2756G n1 = 1948 n2 = 433	A/A	60,99	56,12	0,07
		A/G	33,47	36,72	0,20
		G/G	5,54	7,16	0,21

Полученные результаты свидетельствуют о невысоком вкладе отдельных генных вариантов в риск потери беременности, а эффект, очевидно, зависит от количества факторов риска и их взаимодействия. Поэтому мы

сравнили количества генетических факторов риска в генотипах двух групп женщин. Ни в одном из генотипов не было более 14 факторов риска (из исследованных 31). В генотипах пациенток таких факторов оказалось

значимо больше, чем в генотипах контрольной группы (рис.; Манна-Уитни p -value = 0,0002): в контрольной группе преобладают генотипы с количеством факторов риска от 3 до 6, а у пациенток — от 6 до 11. Очевидно, чем больше в генотипе неблагоприятных аллельных вариантов, ассоциированных с нарушениями течения беременности, тем выше риск невынашивания.

В этой связи представляло несомненный интерес оценить эффективность влияния на риск потери беременности комплексов различных генов, тем более что в целом ряде публикаций приведены факты о значимой роли взаимодействия генов — эффект совместного влияния генов во много раз превосходит сумму их отдельных эффектов. Мы проанализировали все возможные комбинации из 31 гена по парам, триплетам и кварте-

там (табл. 2). В результате статистического анализа выявлено 11 наиболее информативных комплексов генов риска потерь беременности (табл. 10).

Как видно, частоты встречаемости данных комплексов факторов риска в сравниваемых группах статистически значимо различаются, что доказывает связь риска потери беременности с генотипом женщины (OR от 1,75 до 4,46). При этом полиморфный вариант *GT* (*eNOS* G894T) присутствует в 5 из 11 выявленных комплексах риска, *CC* (*F11* T/C) и *ID* (*ACE*) — в 4 комплексах, *ValLeu* (*F13*) и *TC* (*ITGB3*) — в 3, что может свидетельствовать о существенном вкладе этих генных полиморфизмов в нарушение процесса беременности, несмотря на отсутствие статистически значимых различий частот этих полиморфизмов генов в генотипах сравниваемых групп.

Таблица 9

Частоты полиморфизмов генов системы артериального давления в группе пациенток и контрольной группе

№ пп.	Ген, полиморфный вариант	Аллельный вариант	Частота		p
			Пациентки, n1	Контрольная группа, n2	
22	<i>ACE</i> Alu Ins/Del n1 = 2873 n2 = 609	<i>I/I</i>	26,07	23,15	0,14
		<i>I/D</i>	50,40	51,40	0,69
		<i>D/D</i>	23,53	25,45	0,32
23	<i>eNOS</i> 4a/4b n1 = 2876 n2 = 605	<i>4b/4b</i>	63,73	64,46	0,75
		<i>4b/4a</i>	32,02	32,56	0,81
		<i>4a/4a</i>	4,24	2,98	0,17
24	<i>eNOS</i> G894T n1 = 1866 n2 = 470	<i>G/G</i>	53,86	53,83	1,00
		<i>G/T</i>	39,12	37,87	0,63
		<i>T/T</i>	7,02	8,30	0,37
25	<i>PPARA</i> G2528C n1 = 169 n2 = 207	<i>G/G</i>	67,46	62,32	0,33
		<i>G/C</i>	30,77	32,37	0,82
		<i>C/C</i>	1,78	5,31	0,10
26	<i>PPARD</i> +294T/C n1 = 167 n2 = 207	<i>T/T</i>	68,86	66,67	0,66
		<i>T/C</i>	28,14	29,47	0,82
		<i>C/C</i>	2,99	3,86	0,78
27	<i>PPARG</i> Pro12Ala n1 = 170 n2 = 212	<i>Pro/Pro</i>	69,41	68,87	1,00
		<i>Pro/Ala</i>	29,41	27,83	0,73
		<i>Ala/Ala</i>	1,18	3,30	0,31

Продолжение таблицы 9

№ пп.	Ген, полиморфный вариант	Аллельный вариант	Частота		p
			Пациентки, n1	Контрольная группа, n2	
28	<i>PPARGC1A</i> G1564A n1 = 168 n2 = 215	G/G	48,81	55,81	0,18
		G/A	41,67	32,56	0,07
		A/A	9,52	11,63	0,62
29	<i>AGTR1</i> A/C rs5186 n1 = 157 n2 = 179	A/A	54,14	49,72	0,45
		A/C	36,94	42,46	0,32
		C/C	8,92	7,82	0,84
30	<i>BDKRB2</i> I/D n1 = 166 n2 = 211	I/I	33,73	31,75	0,74
		I/D	55,42	49,29	0,25
		D/D	10,84	18,96	0,03
31	<i>APOE</i> Cys112Arg; Arg158Cys n1 = 2314 n2 = 523	E3/E3	64,48	69,41	0,03
		E2/E4	2,16	0,96	0,08
		E3/E2	13,66	11,85	0,29
		E2/E2	0,78	0,57	0,78
		E3/E4	18,06	16,63	0,49
		E4/E4	0,86	0,57	0,79

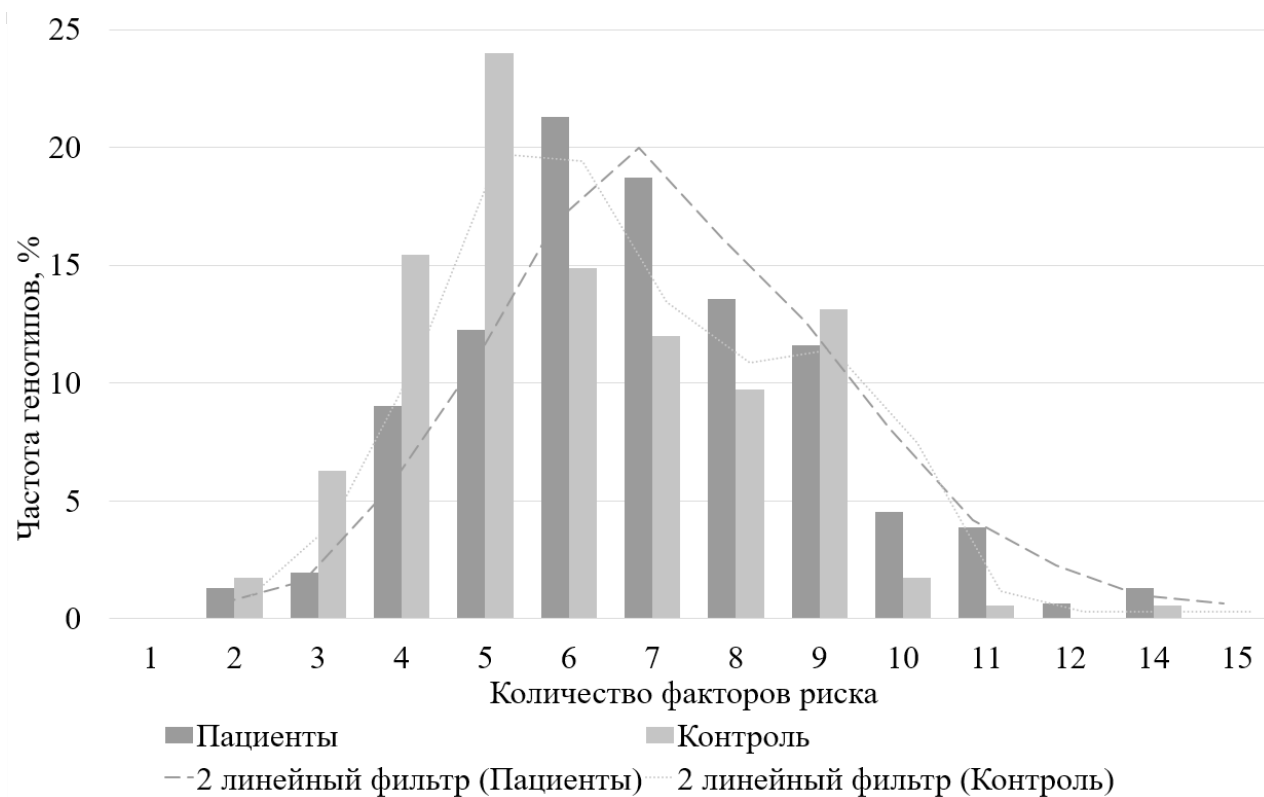


Рис. Распределение частот генотипов (в %) с разным количеством факторов риска невынашивания беременности в контрольной группе и группе пациенток

Таблица 10

Наиболее информативные комплексы генов риска потерь беременности

№ пп.	Комплекс генов	Доля		p	OR	95% CI
		пациентов	контроля			
1	<i>CC</i> (F11 T/C) + <i>GT</i> (eNOS G894T)	17,83	8,99	0,023	2,19	1,09–4,54
2	<i>ID</i> (ACE) + <i>GT</i> (eNOS G894T)	29,30	19,66	0,031	1,75	1,03–3,00
3	<i>TC</i> (ITGB3) + <i>GA</i> (PPARGC1A)	15,29	7,87	0,037	2,15	1,02–4,70
4	<i>TC</i> (ITGB3) + <i>TC</i> (PPARD)	10,19	3,93	0,029	2,78	1,05–8,22
5	<i>ValLeu</i> (F13) + <i>4G4G</i> (PAI-1)	20,38	11,80	0,025	1,98	1,05–3,81
6	<i>E3E4</i> (APOE) + <i>4G4G</i> (PAI-1)	8,92	2,81	0,017	3,49	1,15–12,68
7	<i>ValLeu</i> (F13) + <i>TC</i> (ITGB3)	15,29	6,74	0,013	2,50	1,15–5,71
8	<i>ID</i> (ACE) + <i>ValLeu</i> (F13) + <i>GT</i> (eNOS G894T)	14,01	7,30	0,048	2,13	0,98–4,78
9	<i>TT</i> (EPO) + <i>CC</i> (F11 T/C) + <i>GT</i> (eNOS G894T)	8,28	2,81	0,030	3,11	1,01–11,42
10	<i>ID</i> (ACE) + <i>CC</i> (F11 T/C) + <i>GT</i> (eNOS G894T)	11,46	2,81	0,002	4,46	1,55–15,77
11	<i>ID</i> (ACE) + <i>TT</i> (EPO) + <i>CC</i> (F11 T/C)	9,55	2,81	0,011	3,66	1,23–13,20

Заключение

Приведенные данные свидетельствуют о том, что генетический риск невынашивания беременности обусловлен наличием как отдельных неблагоприятных вариантов генов разных биологических систем, так и взаимодействием различных сочетаний этих генов в генотипе женщины.

Каждый из описанных в работе генных полиморфизмов может вносить не слишком существенный вклад в нарушение физиологического процесса беременности, но существующее взаимодействие генов может многократно усиливать вызываемые этими полиморфизмами эффекты. Например, показано, что сочетание в одном генотипе даже двух-трех неблагоприятных аллельных вариантов генов статистически достоверно увеличивает риск потери беременности. Понятно, что чем больше неблагоприятных факторов в генотипе, тем выше предрасположенность к невынашиванию беременности.

Поэтому недостаточно оценивать вклад каждого отдельного фактора риска в развитие невынашивания беременности. Для корректного выявления величины риска следует использовать комплексный подход и ориентироваться на поиск комбинаций аллельных вариантов риска, а также учитывать общее количество генетических нарушений, ассоциированных

с развитием данной патологии. Чем больше потенциальных факторов риска будет протестировано, тем корректнее будет определена генетическая предрасположенность к невынашиванию беременности.

Выявленные в ходе данной работы наиболее информативные комплексы генов риска репродуктивных потерь позволят количественно оценить уровень генетического риска невынашивания беременности. Такая ДНК-диагностика является, несомненно, актуальной, поскольку неблагоприятные эффекты генов можно корректировать. Выявление высокого генетического риска потери беременности позволит врачам назначать соответствующую терапию для сохранения беременности, что имеет огромное и социальное, и экономическое значение, а также позволит улучшить демографическую ситуацию в стране.

Список использованных источников

1. Баранов, В. С. Цитогенетика эмбрионального развития человека / В. С. Баранов, Т. В. Кузнецова. – Изд-во Н-Л, 2007. – 640 с.
2. Неотложные состояния в акушерстве / В. Н. Серов [и др.] // М ГЭОТАР-Медиа. – 2011. – С. 168–175.
3. Hypofibrinogenemia and the α -Fibrinogen Thr312Ala Polymorphism may be Risk Factors for Early Pregnancy Loss / Yuki Kamimoto

- [et al.] // Clin. Appl. Thromb. – 2017. – Vol. 23, № 1. – P. 52–57.
4. Carter, A. M. Association of the α -fibrinogen Thr312Ala polymorphism with poststroke mortality in subjects with atrial fibrillation / A. M. Carter, A. J. Catto, P. J. Grant // Circulation. – 1999. – Vol. 99, № 18. – P. 2423–2426.
5. The alpha fibrinogen T/A312 polymorphism in the ECTIM study / J. M. Curran [et al.] // Thromb. Haemost. – 1998. – Vol. 79, № 5. – P. 1057–1058.
6. Can Factor V Leiden and prothrombin G20210A testing in women with recurrent pregnancy loss result in improved pregnancy outcomes? Results from a targeted evidence-based review / L. A. Bradley [et al.] // Genet. Med. Off. J. Am. Coll. Med. Genet. – 2012. – Vol. 14, № 1. – P. 39–50.
7. Тромбофилия как важнейшее звено патогенеза осложнений беременности / В. О. Бицадзе [и др.] // Практическая медицина. – 2012. – № 9 (65). – С. 22–29.
8. Sharief, L. T. Congenital factor XIII deficiency in women: a systematic review of literature / L. T. Sharief, R. A. Kadir // Haemophilia. – 2013. – Vol. 19, № 6. – P. e349–e357.
9. Genetic association between FXIII and β -fibrinogen genes and women with recurrent spontaneous abortion: a meta-analysis / J. Li [et al.] // J. Assist. Reprod. Genet. – 2015. – Vol. 32, № 5. – P. 817–825.
10. The association of F11 genetic variants with the risk of incident venous thrombosis among women, by statin use / L. B. Harrington [et al.] // Thromb. Haemost. – 2016. – Vol. 115, № 3. – P. 682 p.
11. Association of F11 polymorphism rs2289252 with deep vein thrombosis and related phenotypes in population of Latvia / V. Rovite [et al.] // Thromb. Res. – 2014. – Vol. 134, № 3. – P. 659–663.
12. Genetic Variations Associated With Recurrent Venous Thrombosis / A. van H. Vlieg [et al.] // Circ. Cardiovasc. Genet. – 2014. – Vol. 7, № 6. – P. 806–813.
13. The fibrinogen gamma (FGG) 10034C>T polymorphism is associated with venous thrombosis / G. Grünbacher [et al.] // Thromb. Res. – 2007. – Vol. 121, № 1. – P. 33–36.
14. Polymorphism in integrin ITGA2 is associated with ischemic stroke and altered serum cholesterol in Chinese individuals / J.-X. Lu [et al.] // Balk. Med. J. – 2014. – Vol. 31, № 1. – 55 p.
15. Фаритовна, М. Э. Ассоциация полиморфизмов генов NOS3 и ITGB3 с риском развития ишемической болезни сердца / М. Э. Фаритовна // Сибирский медицинский журнал. – Томск. – 2016. – Т. 31, № 2. – С. 22–25.
16. Platelet aggregation abnormalities in patients with fetal losses: the GP6 gene polymorphism / J. Sokol [et al.] // Fertil. Steril. – 2012. – Vol. 98, № 5. – P. 1170–1174.
17. Platelet-specific collagen receptor glycoprotein VI gene variants affect recurrent pregnancy loss / A. Siddesh [et al.] // Fertil. Steril. – 2014. – Vol. 102, № 4. – P. 1078–1084.
18. Correlation of coronary heart disease with multiple genes, gene polymorphisms and multiple risk factors in old Chinese Han patients / Y.-F. Sun [и др.] // Zhongguo Ying Yong Sheng Li Xue Za Zhi Zhongguo Yingyong Shenglixue Zazhi Chin. J. Appl. Physiol. – 2012. – Т. 28, № 5. – С. 411–417.
19. Platelet glycoprotein Ibalpha Kozak polymorphism is associated with an increased risk of ischemic stroke / R. I. Baker [и др.] // Blood. – 2001. – Т. 98, № 1. – С. 36–40.
20. Генетические маркеры прогнозирования преэклампсии / И. П. Халфорд-Князева [и др.] // Доктор Рю. – 2013. – № 7-1. – С. 58–66.
21. Polymorphisms in the ACE and PAI-1 genes are associated with recurrent spontaneous miscarriages / T. Buchholz [et al.] // Hum. Reprod. – 2003. – Vol. 18, № 11. – P. 2473–2477.
22. Анализ полиморфизма генов нейронной (nNOS) и эндотелиальной (eNOS) NO-синтаз при плацентарной недостаточности и задержке внутриутробного развития плода / Беспалова О.Н. [и др.] // Журнал акушерства и женских болезней. – 2006. – Т. 55, № 1. – С. 57–62.
23. Мальцева Л. И. Генетические факторы риска развития гестоза у первородящих женщин / Мальцева Л. И., Павлова Т. В. // Практическая медицина. – 2011. – № 48. – С. 113–116.
24. El-Sherbiny, W. S. Endothelial nitric oxide synthase (eNOS) (Glu298Asp) and urotensin II (UTS2 S89N) gene polymorphisms in preeclampsia: prediction and correlation with severity in Egyptian females / W. S. El-Sherbiny, A. S. Nasr, A. Soliman // Hypertens. Pregnancy. – 2013. – Vol. 32, № 3. – P. 292–303.

25. Semple, R. K. PPAR γ and human metabolic disease / R. K. Semple, V. K. K. Chatterjee, S. O'Rahilly // *J. Clin. Invest.* – 2006. – Т. 116, № 3. – С. 581–589.
26. Cresci, S. PPAR genomics and pharmacogenomics: Implications for cardiovascular disease / S. Cresci. – 2008.
27. PPARGC1A sequence variation and cardiovascular risk-factor levels: a study of the main genetic effects and gene x environment interactions in children from the European Youth Heart Study / E. C. Brito [et al.] // *Diabetologia.* – 2009. – Vol. 52, № 4. – P. 609–613.
28. Gene-gene interactions among the peroxisome proliferator-activated receptor polymorphisms for hypertriglyceridemia / S. Gu [et al.] // *Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi.* – 2012. – Vol. 46, № 10. – P. 916–921.
29. Затейщиков, Д. А. Изучение антикоагулянтных свойств эндотелия с помощью стандартного веноокклюзивного теста / Д. А. Затейщиков, А. Б. Добровольский, О. В. Аверков // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* – 1992. – № 12. – С. 605–608.
30. Целуйко, В. И. Генетические аспекты инфаркта миокарда / В. И. Целуйко, Е. И. Попова // *Сердце и сосуды.* – 2008. – № 1. – С. 47–53.
31. Genetic associations of bradykinin type 2 receptor, alpha-adrenoceptors and endothelial nitric oxide synthase with blood pressure and left ventricular mass in outpatients without overt heart disease / R. A. B. Nunes [et al.] // *IJC Heart Vasc.* – 2018. – Vol. 21. – P. 45–49.
32. Apolipoprotein E alleles in women with severe preeclampsia. / B. Nagy [et al.] // *J. Clin. Pathol.* – 1998. – Vol. 51, № 4. – P. 324–325.
33. Davignon, J. Apolipoprotein E polymorphism and atherosclerosis / J. Davignon, R. E. Gregg, C. F. Sing // *Arterioscler. Dallas Tex.* – 1988. – Vol. 8, № 1. – P. 1–21.
34. Исследование ассоциации полиморфизма генов АРОЕ, LPL и NOS3 с риском сосудистой патологии у детей и беременных женщин / Г. А. Сергеевич [и др.] // *Экологическая генетика.* – 2011. – Т. 9, № 4. – С. 25–34.
35. Vascular endothelial growth factor (VEGF)-634G/C polymorphism was associated with severe pre-eclampsia and lower serum VEGF level / S. Salimi [et al.] // *J. Obstet. Gynaecol. Res.* – 2015. – Vol. 41, № 12. – P. 1877–1883.
36. Dynamic HIF1A Regulation During Human Placental Development / F. Ietta [et al.] // *Biol. Reprod.* – 2006. – Vol. 75, № 1. – P. 112–121.
37. Khabour, O. F. Association between polymorphisms in erythropoietin gene and upper limit haematocrit levels among regular blood donors / O. F. Khabour, M. A. Bani-Ahmad, N. M. Hammash // *Transfus. Clin. Biol. J. Soc. Francaise Transfus. Sang.* – 2012. – Т. 19, № 6. – С. 353–357.
38. Роль системных нарушений в формировании гестационных осложнений и их генетическая составляющая / О. Н. Садекова [и др.] // *Акушерство и гинекология.* – 2012. – № 4-2. – С. 21–28.
39. Распространенность тромбофилических полиморфизмов у женщин с привычным невынашиванием беременности в анамнезе / Буштырева И.О. [и др.] // *Акушерство, гинекология и репродукция.* – 2015. – Т. 9, № 2. – С. 13–18.
40. Mamedalieva, N. The role of polymorphisms in genes of folate metabolism and hyperhomocysteinemia in realization of missed abortion in the 1st trimester / N. Mamedalieva, A. Aimbetova, G. Svyatova // *Med. Health Sci. J.* – 2011. – Vol. 6, № 2. – P. 17–22.
41. Bushtireva, I. O. Genetic Polymorphisms Associated with Impaired Folate Cycle and the Risk of Thrombophilia in Patients with Retrochorial Hematoma in the First Trimester of Pregnancy / I. O. Bushtireva, N. B. Kuznetsova, E. I. Pelogei-na // *Modern Technologies in Medicine.* – 2015. – Vol. 7, № 3. – P. 84–88.

N. G. Sedlyar, I. B. Mosse, L. A. Kundas, A. L. Gonchar, M. D. Ameliyanovich

ASSESSMENT OF A MISCARRIAGE RISK BASED ON THE MOLECULAR GENETIC ANALYSIS

State Scientific Institution

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

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

e-mail: n.osennij@gmail.com

An association of 31 polymorphic gene variants of the following systems was investigated: hemostasis, regulation of blood pressure, angiogenesis and folate cycle with a miscarriage. The study involved 2938 women with the unknown causes of a miscarriage and 646 women without pregnancy pathologies. The frequencies of the investigated polymorphic gene variants were determined, the rates of allelic variants between the group of patients and the control group were compared. In the search for combinations of risk genes, 11 complexes of genes associated with a miscarriage were identified, which will allow us to assess the level of a genetic risk. The data will allow medical doctors to prescribe appropriate therapy as a result of which the pregnancy will continue until a successful delivery, which is of great social and economic importance, and will also improve the demographic situation in the country.

Keywords: miscarriage, genetic testing, PCR, angiogenesis, folate cycle, hemostasis, risk assessment, prevention.

Дата поступления статьи: 16 июня 2020 г.

А. А. Гусина¹, А. С. Сталыбко¹, М. И. Колыбенко², Н. П. Бортновская², Н. Б. Гусина¹

СЛУЧАЙ НЕОНАТАЛЬНОГО СИНДРОМА МАРФАНА, ОБУСЛОВЛЕННЫЙ НОВОЙ МУТАЦИЕЙ В ГЕНЕ *FBN1*

¹Республиканский научно-практический центр «Мать и дитя»
Республика Беларусь, 220053, г. Минск, ул. Орловская, д. 66, корп. 9
e-mail: asya.gusina@mail.ru

²Учреждение здравоохранения

«Гомельский областной диагностический медико-генетический центр с консультацией „Брак и семья“»
Республика Беларусь, 246022, Гомель, ул. Кирова, д. 57

Неонатальный синдром Марфана (нСМ) — редкое и наиболее тяжелое проявление фенотипического спектра синдрома Марфана. Большинство случаев нСМ возникает в результате мутаций *de novo* в 23–32 экзонах гена *FBN1*. Для молекулярно-генетического исследования были использованы образцы ДНК пробанда и родителей. Пациенту было проведено секвенирование по Сэнгеру 24–32 экзонов, его родителям — 26 экзона и фланкирующих интронных последовательностей гена *FBN1*. Пробанд мужского пола родился с длиной тела 56 см (>97-го перцентиля). При рождении отмечены черепно-лицевые дисморфии, множественные контрактуры суставов, выраженная арахнодактилия, мегалокарнея. В возрасте четырех месяцев выявлено расширение корня аорты (КА) до 18 мм ($z = +5,2$). В 8 месяцев отмечено увеличение расширения КА до 26 мм ($z = +10,49$), развитие недостаточности атриовентрикулярных клапанов, легочной гипертензии и сердечной недостаточности (СН). Ребенок умер в 10 месяцев от прогрессирующей СН. В результате секвенирования 24–32 экзонов гена *FBN1* у пробанда была выявлена замена с.3172G>T в 26 экзоне гена *FBN1*, которая приводит к замещению остатка глицина в кодоне 1058 на цистеин. У родителей пробанда этот вариант не был обнаружен. Мутация не описана ранее в литературе и не зарегистрирована в контрольных выборках Genome Aggregation Database. По совокупности сведений, с учетом Генетских критериев, клинической картины заболевания у пробанда, отсутствия мутации с.3172G>T у родителей пациента и в контрольных выборках открытых баз данных, выявленный вариант классифицирован как патогенный, возникший *de novo*.

Ключевые слова: неонатальный синдром Марфана, мутации в гене *FBN1*, фибриллин 1, фибриллинопатия, неонатальный, врожденная эмфизема легких, недостаточность атриовентрикулярных клапанов, хроническая сердечная недостаточность.

Введение

Синдром Марфана (ОМIM 154700) — одно из самых частых наследственных заболеваний соединительной ткани. Распространенность СМ составляет 2-3:10000 [1]. Развитие заболевания обусловлено мутациями в гене *FBN1* [2]. Термин «неонатальный синдром Марфана» (нСМ) для описания наиболее тяжелых случаев, которые ранее характеризовали как инфантильный, врожденный или тяжелый перинатальный СМ, впервые использовали в 1991 г. Buntinx и соавторы [3]. Частота нСМ среди пациентов с СМ младше 18 лет составляет 14% [4]. Диагностические критерии для нСМ, в отличие от классического СМ, не разработаны. Ключевыми отличиями этой фор-

мы заболевания являются манифестация при рождении или в неонатальном периоде, тяжелая быстро прогрессирующая недостаточность атриовентрикулярных клапанов (АВК), приводящая к развитию хронической сердечной недостаточности (СН), которая является основной причиной смерти таких пациентов в течение первых двух лет жизни [5, 6]. Характерными проявлениями нСМ также считают врожденную эмфизему легких [7], дряблость, «избыточность» кожи, «старческий вид» ребенка, контрактуры суставов, мегалокарнея, подвывих хрусталиков [1], дефекты диафрагмы (грыжа, эвентрация), арахнодактилию, расширение крупных сосудов [8]. В отличие от классического СМ большинство случаев

нСМ возникает в результате мутаций *de novo* в 23–32 экзонах гена *FBN1* [6].

Материалы и методы

В качестве материала для молекулярно-генетического исследования использовали образцы ДНК пробанда и родителей, выделенные из лейкоцитов методом солевой экстракции [9]. Родители пациента дали информированное согласие на проведение молекулярно-генетического тестирования им и ребенку. Пациенту было проведено секвенирование по Сэнгеру 24–32 экзонов, его родителям — 26 экзона и фланкирующих интронных последовательностей гена *FBN1* на автоматическом анализаторе ABI 3500 (Applied Biosystems, США). Амплификация экзонов гена проводилась с помощью олигонуклеотидных праймеров, предложенных Nijbroek и соавторами [10] на амплификаторе Veriti Thermal Cycler (Applied Biosystems, США). Данные секвенирования соотносили с референтной последовательностью NM_000138.5. Поиск сведений о мутации осуществлялся в открытых базах данных о мутациях в гене *FBN1* (<http://www.umd.be/FBN1/>, [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/?term=FBN1\[gene\]](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/?term=FBN1[gene])), а также в выборках Genome Aggregation Database.

Оценку патогенности выявленных мутаций осуществляли на основании Гентских критериев от 2010 г. [11], а также с использованием ресурса VarSome (<https://varsome.com/>).

Результаты и обсуждение

Пробанд мужского пола родился от первой беременности у молодых супругов, состоящих в неродственном браке. Роды произошли в срок путем кесарева сечения. Пробанд родился с массой 2700 г (3-й перцентиль), длиной тела 56 см (>97-го перцентиля), окружностью головы 35 см (50-й перцентиль), с оценкой по шкале Апгар 8/8 баллов. При рождении у пробанда отмечены черепно-лицевые дисморфии, множественные контрактуры суставов, выраженная арахнодактилия, мегалокорнея.

В 4 месяца пациент госпитализирован в связи с белково-энергетической недостаточностью (дефицит массы тела 24%) и задержкой психомоторного развития. При поступлении масса 4270 г (менее 3-го перцентиля), длина тела 70 см (более 97-го перцентиля, + 14 см за

4 месяца), мышечная гипотония, задержка психомоторного развития: голову не удерживает, улыбается и гулит редко, прослеживает за предметом непостоянно, опоры на предплечья нет, проба на тракцию отрицательная, сухожильные рефлексы одинаковы с обеих сторон.

При эхокардиографии (ЭХО-КГ) выявлено расширение корня аорты до 18 мм ($z = +5,2$), открытое овальное окно 3,3 мм и расположенное рядом межпредсердное сообщение — 2,0 мм, расширение правого предсердия. Изменений со стороны клапанов сердца, признаков недостаточности клапанов не отмечено, сократительная функция миокарда сохранена. На электрокардиограмме (ЭКГ): ритм синусовый, отклонение электрической оси сердца вправо, признаки перегрузки правого предсердия, правого желудочка, неполная блокада правой ножки пучка Гиса, нерезко выраженные диффузные изменения в миокарде. Кардиологом констатирована недостаточность кровообращения (НК) 1 степени и назначена терапия эналаприлом. При рентгенографии и компьютерной томографии (КТ) легких обнаружены воронкообразная деформация грудной клетки, деформации обеих ключиц, фиброателектаз нижней доли правого легкого, фиброзные изменения в задних сегментах обоих легких, частичная релаксация правого купола диафрагмы. При ультразвуковом исследовании головного мозга обнаружена минимальная смешанная гидроцефалия, вазоконстрикция по артериальному типу. При бронхоскопии, ультразвуковом исследовании органов брюшной полости, эзофагогастродуоденоскопии патологических изменений не найдено. В общем анализе крови: лейкоцитоз $19,2 \times 10^9$, гемоглобин 158 г/л, эритроциты $5,13 \times 10^{12}$ /л, лейкоцитарная формула и СОЭ не изменены. В общем анализе мочи отмечено большое количество фосфатов. В копрограмме патологических изменений не выявлено.

Для коррекции дефицита массы тела введено дополнительное кормление через зонд. Медикаментозное лечение включало эналаприл, витамины А и Е, пантокальцин. Спустя 21 день пациент выписан с массой 4390 (+120 г).

В возрасте 8 месяцев пациент был госпитализирован в связи с внегоспитальной пневмонией. При поступлении в стационар масса тела 4800 г (менее 3-го перцентиля, дефицит массы тела 39%), выраженная задержка психомотор-

ного развития: ребенок не удерживает голову, не переворачивается на живот, не лепечет. При ЭХО-КГ выявлено прогрессирование расширения корня аорты до 26 мм (+8 мм за 5 месяцев, $z = +10,49$), расширение ствола легочной артерии (ЛА), легочная гипертензия, регургитация 2 ст. на клапане ЛА, изменения створок митрального клапана (МК), пролапсы МК и трикуспидального клапанов (ТК) с регургитацией 2 ст. на этих клапанах, расширение правых отделов сердца, гипертрофия миокарда левого желудочка.

ЭКГ по сравнению с исследованием в возрасте 4 месяцев — без существенных изменений. При Холтеровском мониторинге ЭКГ зафиксированы основной синусовый ритм, неполная блокада правой ножки пучка Гиса, нарушение процессов реполяризации. При Р-графии органов грудной клетки в отмечено расширение тени средостения за счет камер сердца (кардио-торакальный индекс 0,60). Кардиологом установлены недостаточность клапана ЛА 2 ст., ТК 2 ст., МК 3 ст., легочная гипертензия, НК 2А ст.

В период пребывания в стационаре у пациента развился обструктивный ателектаз левого легкого, в связи с чем он был переведен в отделение интенсивной терапии. Пациент получал антибактериальную терапию, метопролол,

фуросемид, эналаприл, аэрозоль пульмовента, свежезамороженную плазму. Спустя 1,5 месяца от момента госпитализации переведен под паллиативное наблюдение в стационар по месту жительства с массой 4945 г, где умер в возрасте 10 месяцев. Причиной смерти стала нарастающая СН.

В результате секвенирования экзонов гена *FBNI* у пробанда была выявлена мутация p.Gly1058Cys (NM_000138.5:c.3172G>T). У родителей пациента мутация не была обнаружена. Результаты секвенирования показаны на рисунке.

В открытых базах данных и доступных авторам источниках литературы в гене *FBNI* описано более 3000 патогенных, вероятно патогенных мутаций и вариантов с неопределенной клинической значимостью [12]. При нСМ наиболее частыми являются миссенс-мутации в 23–32 экзонах гена *FBNI*, при этом 58% замен локализуются в 25 и 26 экзонах [13]. Редко причиной заболевания становятся нонсенс-мутации, мутации сплайсинга, делеции экзонов [5, 13, 14].

В нашем случае у пациента выявлена замена 3172G>T, что приводит к замещению остатка глицина на цистеин в позиции 1058. Мутация нарушает консервативную для cbEGF-like доменов последовательность аминокислот и со-

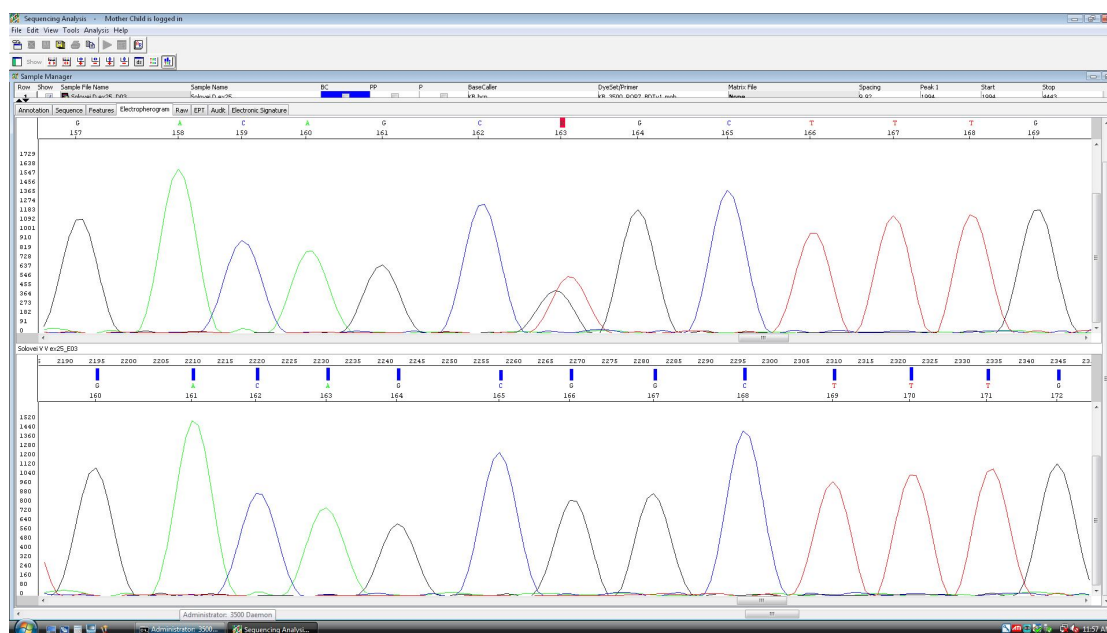


Рис. Результаты секвенирования 26 экзона гена *FBNI* у пробанда и его матери

А — мутация c.3172G>T в гетерозиготном состоянии у пробанда, Б — нормальная последовательность 26 экзона у матери пробанда

проводится появлением дополнительного остатка цистеина. Таким образом, в соответствии с Гентскими критериями пересмотра 2010 г. замена p.Gly1058Cys может рассцениваться как патогенная. Мутация локализуется в 26 экзоне гена *FBNI*, который кодирует синтез 11-го cbEGF-like домена белка. Ранее в этом кодоне описаны мутации c.3172G>A (p.Gly1058Ser), p.Gly1058Asp (c.3173G>A), p.Gly1058Val (c.3173G>T), и p.Gly1058_Phe1059insCys (c.3175insTGC). Мутация p.Gly1058Asp выявлена у пациентки в возрасте 30 лет с классическим СМ [15], p.Gly1058Ser классифицирована как вариант с неопределенной клинической значимостью у пациента с изменениями со стороны сердечно-сосудистой системы, при этом заболевание у этого лица не было определено как СМ.

Мутация p.Gly1058_Phe1059insCys, при которой, как и в нашем случае, возникает дополнительный остаток цистеина, описана Milewicz и Duvic у пациента с нСМ [16]. По сведениям авторов, у этого ребенка так же, как и у нашего пациента, при рождении были обнаружены дисморфии, большие уши, дряблость, «избыточность» кожи лица и шеи, долихостеномия, арахнодактилия, контрактуры суставов, гипотония. Кроме того, были отмечены килевидная деформация грудной клетки и двухсторонний подвывих хрусталиков. У описываемого нами пробанда была воронкообразная деформация грудной клетки и отсутствовал подвывих хрусталиков. При эхокардиографии у пациента Milewicz и Duvic выявлено расширение корня аорты, дисплазия МК. У ребенка быстро прогрессировала недостаточность аортального и митрального клапанов. В возрасте 7 месяцев вследствие нарастающей дыхательной недостаточности он был переведен на искусственную вентиляцию легких. Смерть наступила в 21 месяц. При аутопсии отмечены расширение корня аорты, расширение левого предсердия и желудочка, anomальное строение МК, клапанов аорты и легочной артерии, эмфизема легких и множественными буллами. Авторы отметили, что фибробласты пациента синтезировали нормальное количество фибриллина 1, однако его секреция в межклеточное вещество была замедленной. Содержание фибриллина 1 в экстрацеллюлярном матриксе в культуре клеток пациента было снижено и присутствовал профи-

бриллин, что и ранее было отмечено у пациентов с нСМ. По мнению исследователей, появление дополнительного остатка цистеина приводит к нарушению образования дисульфидных связей и правильной структуры доменов, изменяет междоменные взаимодействия, в результате чего мутантные молекулы дольше приобретают структуру необходимую для секреции и поэтому более длительное время пребывают в клетке. Milewicz и Duvic также предположили, что формирование дисульфидных связей между молекулами фибриллина 1 в экстрацеллюлярном матриксе также может быть неправильным.

Как правило, развитие нСМ обусловлено мутациями, возникшими *de novo*. Описаны случаи, когда нСМ был диагностирован у детей, родители которых страдали СМ либо были фенотипически здоровы, однако являлись носителями мутаций в гене *FBNI* в мозаичной форме [5]. Герминальный мозаицизм у лиц, имеющих детей с нСМ, также является хорошо известным феноменом, распространенность которого, по мнению многих авторов, недооценена [5]. В нашем случае при исследовании геномной ДНК, выделенной из лейкоцитов крови родителей пробанда, мутация обнаружена не была, что позволяет предположить мутацию *de novo*, однако не исключает возможности герминального мозаицизма. Таким образом, риск повторного рождения ребенка с данным заболеванием в этой семье был определен равным 2–3%.

Прогноз при нСМ неблагоприятный: летальность при этом заболевании составляет более 50% [1, 8, 13]. По сведениям Stheneur и соавторов факторами неблагоприятного прогноза являются расширение аорты, недостаточность функции клапанов сердца, наличие диафрагмальной грыжи, мутации в 25 и 26 экзонах гена *FBNI*. Таким образом, прогноз у нашего пациента рассценивался как неблагоприятный на основании результатов молекулярно-генетического исследования еще до выявления недостаточности АВК.

Подходы к лечению нСМ изучены недостаточно. С целью замедления прогрессирования расширения крупных сосудов применяют бета-блокаторы, антагонисты рецепторов ангиотензина II, комбинированную терапию этими препаратами [17]. При развитии — ингибиторы ангиотензинпревращающего фермента, мочегонные [1]. Хирургическая

коррекция недостаточности клапанов сердца существенно улучшает состояние пациентов и прогноз заболевания [1, 18].

Пrenатальная диагностика нСМ с учетом тяжести клинических проявлений и неблагоприятным прогнозом заболевания представляется актуальной как для семей, имеющих детей с этим заболеванием, при невозможности уточнить наличие герминального мозаицизма, так и для родителей, страдающих СМ. Подробное исследование возможностей инструментальной пренатальной диагностики нСМ представлено Veiga-Fernandez и соавторами [8]. Следует отметить, что признаки нСМ можно обнаружить с помощью ультразвукового исследования или магнитно-резонансной томографии, как правило, не ранее второго триместра беременности. В случаях, когда у пробанда установлена мутация в гене *FBN1*, возможно проведение пренатальной диагностики в ранние сроки беременности или предимплантационной диагностики.

Заключение

Неонатальный синдром Марфана — весьма редкое наследственное заболевание из группы наследственных дисплазий соединительной ткани. Нам удалось диагностировать новый случай синдрома, обусловленный не описанной ранее мутацией в 26 экзоне гена *FBN1* и определить особенности фенотипа, ассоциированные с наличием дополнительного остатка цистеина в 11-м cbEGF-like домене фибриллина 1. Ранняя молекулярная диагностика позволяет верифицировать диагноз нСМ, оптимизировать лечение, уточнить прогноз и оценить риск повторного рождения ребенка с нСМ в семье.

Список использованных источников

1. Elliott, J. A case of neonatal Marfan syndrome: a management conundrum and the role of a multidisciplinary team / J. Elliott [et al] // *Case Rep. Pediatr.* — 2017. — Vol. 2017. — P. 1-6. doi: 10.1155/2017/8952428.
2. Dietz, H. C. Marfan syndrome caused by a recurrent de novo missense mutation in the fibrillin gene / H. C. Dietz [et al] // *Nature.* — 1991. — Vol. 352. — P. 337–339.
3. Buntinx, I. M. Neonatal Marfan syndrome with congenital arachnodactyly, flexion contractions, and severe cardiac valve insufficiency / I. M. Buntinx [et al] // *J Med Genet.* — 1991. — Vol. 28. — P. 267–273.
4. Faivre, L. Clinical and molecular study of 320 children with Marfan syndrome and related type I fibrillinopathies in a series of 1009 probands with pathogenic *FBN1* mutations / L. Faivre [et al] // *Pediatrics.* — 2009. — Vol. 123. — P. 391–398.
5. Le Gloan, L. Neonatal Marfan Syndrome: report of a case with an inherited splicing mutation outside the neonatal domain / L. Le Gloan [et al] // *Mol. Syndromol.* — 2015. — Vol. 6. — P. 281–286. doi 10.1159/000443867.
6. Sole-Ribalta, A. Neonatal Marfan syndrome: a rare, severe, and life-threatening genetic disease / A. Sole-Ribalta [et al] // *J. Pediatr.* — 2019. — Vol. 211. — P. 221. doi 10.1016/j.jpeds.2019.03.033.
7. Hennekam, R. C. Severe infantile Marfan syndrome versus neonatal Marfan syndrome / R. C. Hennekam // *Am. J. Med. Genet. A.* — 2005. — Vol. 139, № 1. — P. 1.
8. Veiga-Fernandez, A. Perinatal diagnosis and management of early-onset Marfan syndrome: case report and systematic review / A. Veiga-Fernandez [et al] // *The journal of maternal-fetal & neonatal medicine.* — 2019. — Vol. 17. — P. 1–12. doi.org/10.1080/14767058.2018.1552935
9. Salah, M. A. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques / M. A. Salah [et al] // *Nucleic Acids Res.* — 1997. — Vol. 25, № 22. — P. 4692–4693.
10. Nijbroek, G. Fifteen novel *FBN1* mutations causing Marfan syndrome detected by heteroduplex analysis of genomic amplicons / G. Nijbroek [et al] // *Am. J. Hum. Genet.* — 1995. — Vol. 57, № 1. — P. 8–21.
11. Loeys, B. L. The revised Ghent nosology for the Marfan syndrome / B. L. Loeys [et al] // *J. Med. Genet.* — 2010. — Vol. 47. — P. 76–485. doi:10.1136/jmg.2009.072785
12. Collod-Bérout, G. Update of the *UMD-FBN1* mutation database and creation of an *FBN1* polymorphism database / G. Collod-Bérout [et al] // *Hum. Mutat.* — 2003. — Vol. 22. — P. 199–208. doi: 10.1002/humu.10249.
13. Stheneur, C. Prognosis factors in probands with an *FBN1* mutation diagnosed before the age of 1 year / C. Stheneur [et al] // *Pediatric Research.* — 2011. — Vol. 69, № 3. — P. 265–270. doi: 10.1203/pdr.0b013e3182097219.
14. Maeda, J. Variable severity of cardiovascular phenotypes in patients with an early-onset

form of Marfan syndrome harboring *FBNI* mutations in exons 24–32 / J. Maeda [et al] // Heart Vessels – 2016. – Vol. 31, № 10. – P. 1717–1723. doi: 10.1007/s00380-016-0793-2.

15. Arbustini, E. Identification of Sixty-two Novel and Twelve Known *FBNI* Mutations in Eighty-one Unrelated Proband With Marfan Syndrome and Other Fibrillinopathies / E. Arbustini [et al] // Hum Mutat. – 2005. – Vol. 26, № 5. – P. 494.

16. Milewicz, D. M. Severe neonatal Marfan syndrome resulting from a de novo 3-bp inser-

tion into the fibrillin gene on chromosome 15 / D. M. Milewicz [et al] // Am. J. Hum. Genet. – 1994. – Vol. 54, № 3. – P. 447–453.

17. Lu-Hang Liu. Losartan in combination with propranolol slows the aortic root dilatation in neonatal Marfan syndrome / Lu-Hang Liu [et al] // Pediatr. Neonatol. 2018. – Vol. 59, № 2. – P. 211–213. doi: 10.1016/j.pedneo.2017.07.005

18. Tognato, E. Neonatal Marfan Syndrome / E. Tognato [et al] // Am. J. Perinatol. – 2019. – Vol. 36 (suppl S2). – P. S74–S76

A. A. Gusina¹, A. S. Stalybko¹, M. I. Kolybenko², N. P. Bartnovskaja², N. B. Gusina¹

A CASE OF NEONATAL MARFAN SYNDROME CAUSED BY A NEW MUTATION IN THE *FBNI* GENE

¹Republican Scientific and Practical Centre “Mother and Child”

66/9 Orlovskaya St., 220053 Minsk, the Republic of Belarus

e-mail: asya.gusina@mail.ru

²Health Care Institution

“Gomel Regional Diagnostic Medicogenetic Centre with Consultation “Marriage and Family”

57, Kirov St., 246022 Gomel, the Republic of Belarus

Neonatal Marfan syndrome (nMFS) is the rare and most severe manifestation of the phenotypic spectrum of Marfan syndrome. The majority of nMFS cases result from *de novo* mutations in 23–32 exons of the *FBNI* gene. DNA samples from a proband and his parents were used for molecular genetic testing. The patient underwent Sanger sequencing of 24–32 exons and his parents of exon 26 and flanking intron sequences of the *FBNI* gene. The male proband was born with a body length of 56 cm (>97th percentile). At birth, cranio-facial dysmorphism, multiple joint contractures, severe arachnodactyly, and megalocornea were noted. At the age of 4 months, aortic root (AR) enlargement to 18 mm was revealed ($z = +5.2$). AR ectasia reached 26 mm ($z = +10.49$) and the development of atrioventricular valve insufficiency, pulmonary hypertension and heart failure were observed at 8 months. The child died at 10 months from progressive heart failure. Sequencing of 24–32 exons of the *FBNI* gene in the proband revealed the c.3172G>T substitution in exon 26 of the *FBNI* gene, which leads to the replacement of the glycine residue in codon 1058 with cysteine. The mutation was not detected in proband's parents. The mutation has not been previously described in literature or registered in the control samples of the Genome Aggregation Database. Based on the cumulative data and taking into account the Ghent criteria, the clinical picture of the disease in the proband, the absence of the c.3172G>T mutation in patient's parents and in the control samples of open databases, the identified variant was classified as pathogenic and arisen *de novo*.

Keywords: neonatal Marfan syndrome, *FBNI* gene mutations, fibrillin 1, fibrillinopathy, neonatal, congenital pulmonary emphysema, atrioventricular valve insufficiency, congestive heart failure.

Дата поступления статьи: 6 марта 2020 г.

ОСКАР ОСКАРОВИЧ КЕДРОВ-ЗИХМАН (1920–1991)



К 100-летию Кедрова-Зихмана Оскара Оскаровича — заведующего лабораторией популяционной генетики Института генетики и цитологии АН БССР, доктора биологических наук, профессора, лауреата Государственной Премии Белорусской ССР в области науки, участника Великой Отечественной войны.

Оскар Оскарович Кедров-Зихман родился 4-го августа 1920 года в городе Умани, Киевской области, УССР. В 1939 году по окончании полной средней школы поступил в Московский станкоинструментальный институт им. И. В. Сталина. С первого курса института в 1939 году, был призван в ряды Красной Армии. До 1941 г. служил в Прибалтийском военном округе в стрелковой дивизии — старшиной технической службы, как старший оружейный мастер. Принимал участие в Великой Отечественной войне с первых дней и до ее окончания в звании старшины технической службы 48 стрелковой дивизии Прибалтийского военного округа и 623 отдельной разведывательной дивизии Ленинградского и Карело-Финского фронтов.

После окончания войны Оскар Оскарович вернулся в Москву и поступил в Московскую с/х академию им. К. А. Тимирязева, по специальности «Селекция и семеноводство овощных культур». По окончании получил Диплом с отличием, квалификацию «Ученый агроном» и рекомендацию в аспирантуру. В 1952 г. он поступил в аспирантуру НИИ овощного хозяйства МСХ РСФСР, подготовил кандидатскую диссертацию, которую успешно защитил в Институте биологии АН БССР в Минске, куда переехал на постоянную работу. С 1955 года и до последних дней жизни его работа связана с Академией наук БССР. До 1960 года он работал в Центральном ботаническом саду АН БССР, в 1960 году, по приглашению академика АН БССР Николая Васильевича Турбина перешел на работу в Институт биологии. После создания Института генетики и цитологии продолжил свою работу в этом учреждении. С 1971 года Оскар Оскарович — заведующий лабораторией популяционной генетики этого института.

Основная тематика научных исследований, выполняемая коллективом лаборатории под руководством Оскара Оскаровича была связана с разработкой теоретических основ и методических приемов создания генетически сбалансированных гетерозисных популяций растений и, в частности, озимой ржи. Оригинальным направлением, требующим специальной подготовки, являлись проблемы математического моделирования действия генов, ответственных за проявление гетерозиса в таких популяциях.

В процессе исследований была создана оригинальная коллекция инбредных линий озимой ржи на генетическом материале ряда наиболее распространенных сортов, включающая линии с обширным разнообразием биологических и хозяйственно ценных признаков. Коллекция представляет интерес не только для изучения культуры озимой ржи, но может использоваться в качестве исходного материала при селекции синтетических сортов и гибридов. Оригинальность методических разработок по способам селекции перекрестно опыляющихся растений, защищена авторскими свидетельствами и многочисленными публикациями в периодических журналах и монографиях. Активное и дружное участие сотрудников лаборатории популяционной генетики в выполнении запланированной работы способствовало получению новых и ценных результатов, оформлению их для публикаций и защиты кандидатских диссертаций.

Оскар Оскарович активно обсуждал результаты исследования на различного уровня отечественных и международных конференциях и семинарах.

В 1979 году им была успешно защищена докторская диссертация «Поликросс-тест в селекции растений», в которой осуществлялся теоретический анализ эффективности се-

лекционного процесса с использованием множественных скрещиваний при выведении синтетических сортов и гибридов перекрестноопыляющихся растений. Предложенные оригинальные математические модели позволили вскрыть закономерности генетических процессов, протекающих в популяциях растений, сформированных на основе отбора компонентов по комбинационной способности и прогнозировать эффективность селекции при различных типах аллельного взаимодействия.

Оскар Оскарович Кедров-Зихман Лауреат Государственной Премии Белорусской ССР в области науки за цикл работ «Генетика гетерозиса и пути его использования в селекции растений», выполненных коллективом сотрудников Института генетики и цитологии НАН БССР. Указом Президиума Верховного Совета БССР он награжден Почетной грамотой Верховного Совета БССР за успехи в развитии науки, подготовки высококвалифицированных специалистов для народного хозяйства.

Кедров-Зихман О.О награжден орденом «Отечественной войны», медалями: «За победу над Германией», «За оборону Ленинграда», а также юбилейной медалью «За доблестный труд в ознаменование 100-летия со дня рождения В. И. Ленина», тремя бронзовыми медалями ВДНХ СССР.

Бывшие коллеги по лаборатории популяционной генетики и сотрудники Института генетики и цитологии НАН Беларуси сохраняют в сердцах светлую память об Оскаре Оскаровиче.

ИНСТРУКЦИЯ ДЛЯ АВТОРОВ ПО ОФОРМЛЕНИЮ СТАТЕЙ

Редакция сборника научных трудов «Молекулярная и прикладная генетика» принимает к рассмотрению обзорные статьи и экспериментальные статьи по результатам исследований, выполненных с использованием современных методов в области молекулярной и прикладной генетики, отражающие изучение фундаментальных генетических процессов на молекулярном, клеточном, организменном и популяционном уровнях. Особое внимание уделяется актуальным проблемам биоинформатики и системной биологии, биоинженерии, вопросам сохранения и рационального использования генетических ресурсов, а также исследованиям, основанным на междисциплинарном подходе.

Статьи публикуются на русском, белорусском и английском языках.

Сборник входит в Перечень научных изданий, рекомендованных ВАК для опубликования результатов диссертационных работ (для биологических, медицинских (медико-биологические аспекты), сельскохозяйственных наук), и реферируется и индексируется в РИНЦ (Российский индекс научного цитирования).

Решение о публикации принимается редакционной коллегией после рецензирования, учитывая научную значимость и актуальность представленных материалов.

ДЛЯ ОПУБЛИКОВАНИЯ РАССМАТРИВАЮТСЯ СЛЕДУЮЩИЕ ТИПЫ СТАТЕЙ

Экспериментальная статья

Основной тип статей, размещаемых в сборнике. Этот формат предназначен для публикации полученных авторами новых данных, представляющих существенный интерес для научного сообщества. Объем экспериментальной статьи не должен превышать 12 страниц. В список использованных источников следует включать не более 30 источников.

Обзорная статья

Авторы могут предложить для публикации обзорную статью по теме, представляющей интерес для широкого круга читателей. Объем обзорной статьи не должен превышать 15 страниц. В список использованных источников следует включать не более 50 источников.

Краткое сообщение

В исключительных случаях по решению редколлегии в сборнике публикуются краткие сообщения объемом не более 5 страниц, список литературы в этом случае не должен включать более 15 источников.

СТРУКТУРА СТАТЬИ

Статья набирается в текстовом редакторе Microsoft Word. Поля: верхнее и нижнее — 2 см, левое — 3 см, правое — 1,5 см. Текст набирается шрифтом Times New Roman, 12 пт, в одну колонку с одинарным межстрочным интервалом. Выравнивание — по ширине. Абзацный отступ — 1,25 см. Не допускается использование табуляции или пробелов для обозначения первой строки абзаца. Автоматическая расстановка переносов обязательна. Все страницы должны быть пронумерованы. Для создания формул следует использовать только **MathType**.

1. УДК

Располагается в верхнем левом углу страницы.

2. Инициалы и фамилии авторов

Располагаются по центру, выделяются полужирным начертанием. Между инициалами и перед фамилией ставятся неразрывные пробелы (Ctrl + Shift + пробел) (**И. И. Иванов**).

3. Название статьи

Располагается по центру, набирается **ПРОПИСНЫМИ БУКВАМИ** полужирным начертанием. Переносы в заголовках не допускаются.

Название статьи должно четко отражать суть работы, не содержать лишних слов. По возможности следует избегать узкой региональности, а данные о географии исследования давать в резюме.

4. Место работы авторов с почтовым адресом

Место работы авторов (аббревиатура не допускается) располагается по центру, набирается прямым начертанием. На следующей строке указывается почтовый адрес учреждения (страна, индекс, город, улица, дом).

Если авторы работают в разных учреждениях, то после каждой фамилии и перед соответствующим местом работы надстрочными знаками проставляется цифровой индекс (1, 2 и т. д.).

5. Авторское резюме (аннотация)

Располагается после места работы авторов, набирается прямым начертанием.

Авторское резюме должно полно и понятно излагать основное содержание и результаты проведенного исследования. Если из названия статьи очевидны предмет, тема, цель, методы исследования, их не следует повторно излагать в резюме. Объем текста аннотации определяется содержанием публикации (объемом сведений, их научной ценностью и/или практическим значением) и должен быть в пределах 800-1000 знаков с пробелами.

6. Ключевые слова (5–10 слов)

Перечисляются после слов «**Ключевые слова:**». В конце ставится точка.

7. Основной текст статьи

Экспериментальная статья должна включать следующие разделы: «**Введение**», «**Материалы и методы**», «**Результаты и обсуждение**», «**Заключение**», «**Список использованных источников**». Обзорная статья и краткое сообщение в обязательном порядке должны содержать разделы: «**Введение**», «**Заключение**» и «**Список использованных источников**». Название остальных разделов выбирается на усмотрение авторов.

Названия разделов располагаются на отдельной строке по центру и выделяются полужирным начертанием.

Изложение статьи должно быть ясным, сжатым, без длинных исторических введений и повторений.

Помимо общепринятых сокращений единиц измерения, физических, химических и математических величин и терминов (например, ДНК), допускаются аббревиатуры словосочетаний, часто повторяющихся в тексте. Все вводимые автором буквенные обозначения и аббревиатуры должны быть расшифрованы в тексте при их первом упоминании.

Вставка в текст символов (например, β , ϵ) производится только через опцию Вставка/Символ.

Для набора надстрочных и подстрочных символов (C^2 , C_4) использовать меню *Шрифт/Надстрочный знак/Подстрочный знак*.

Общие правила набора текста

Прямое начертание должны иметь:

- 1) греческие символы (α , β , δ , ϕ , λ и др.) и знаки ($\%$, $\leq$, $\pm$, $\times$, $\neq$, ∞ , $\rightarrow$, $^\circ$, $\notin$ и др.);
- 2) единицы измерения (Вт, В, Дж, кг, м и пр.);
- 3) кириллические (т. е. русские) буквы (П, Л, Ц);
- 4) сокращения от русских или белорусских слов ($q_{\text{св}}$);
- 5) обозначения химических элементов и соединений (Р, H_2O);
- 6) названия белков;
- 7) скобки () и запятые (,) в формулах и после них ($x^2 - 0,5b(1,5 + ca)$).

Курсивное начертание должны иметь названия генов, латинские (т. е. английские) буквы, обозначающие переменные (K , y , z , x , V , i , j), латинские названия семейств, родовые и видовые названия.

Без пробелов следует проставлять:

- 1) дефис (–) в сложных словах (минерал-индикатор, К-пространство) и при наращении падежных окончаний к цифрам и буквам (1-го, j-го);
- 2) короткое тире (–) (Ctrl + «–» на нумерационной клавиатуре) между цифрами, обозначающими пределы какой-либо величины (20–30 чел.);
- 3) знаки –, +, ≤, > в значении положительной или отрицательной величины, степени увеличения или уменьшения;
- 4) знак %;
- 5) скобки () и кавычки «» от заключенных в них слов (по всей работе кавычки должны быть одного рисунка — «елочки»).

С пробелами проставлять:

- 1) тире (—) (Ctrl + Alt + «—» на нумерационной клавиатуре) с обеих сторон пробелом как знак препинания между словами.
- 2) математические знаки (–, +, ≤, ±, ·, ×, =, ≠ и др.) в формулах, уравнениях, когда они являются знаками арифметического действия ($R_1 + R_2 = 0,75$);
- 3) знаки №, § от следующих за ними чисел (№ 4);
- 4) многозначные целые числа, содержащие 5 и более знаков, разбиваются по 3 цифры справа налево (40 450, 8 345 458);
- 5) сокращенные слова от имен собственных, к которым они относятся (ул. Академическая);
- 6) цифры от полных или сокращенных наименований (100 м, 2005 г.).

Требования к рисункам

Растровые изображения должны иметь разрешение не менее 300 dpi для полутоновых изображений (фотографии, газетные вырезки, книжные иллюстрации) и не менее 600 dpi для штриховых изображений (графики, таблицы, детали, выполненные чертежными инструментами). Повышение разрешения после сканирования программными средствами недопустимо.

Рисунки должны размещаться только после их упоминания в тексте статьи. Если ссылка на рисунок включена в предложение, используется полное написание — «рисунок 1»; если слова заключаются в скобки, используется сокращение — (рис. 1).

Слово **Рис. 1.** и подрисовочная подпись располагаются на следующей строке после самого рисунка (**Рис. 1.** Название). Точка после названия не ставится.

Рисунки должны быть представлены в электронном виде отдельными файлами в следующих форматах: JPEG, TIFF, PNG. Название файла должно соответствовать номеру рисунка (Рис. 1, Рис. 2 и т. д.). Для отправки все файлы рисунков объединяются в одну архивную папку zip или rar. Не допускается размещение рисунков в конце статьи (перед списком литературы).

Оформление таблиц

Таблицы должны быть реализованы средствами работы с таблицами редактора Microsoft Word. Не допускается вложение таблиц, созданных в других программах.

Таблицы должны быть пронумерованы и иметь названия, размещаться только после их упоминания в тексте статьи. Если ссылка на таблицу включена в предложение, используется полное написание — «таблица 1»; если слова заключаются в скобки, используется сокращение — (табл. 1).

Слово **Таблица 1** выравнивается по правому краю и выделяется полужирным начертанием.

На следующей строке за словом **Таблица 1** следует название таблицы, которое набирается прямым начертанием и выравнивается по центру (без абзацного отступа).

Примечание к таблице располагается на следующей строке после таблицы. Слово **Примечание** выделяется полужирным начертанием, после него ставится точка. Текст примечания следует за словом **Примечание** и начинается с прописной буквы. Точка после текста примечания не ставится.

Четко указывается размерность показателей. Цифры в таблицах должны соответствовать своему упоминанию в тексте статьи.

Не допускается размещение таблиц в конце статьи (перед списком литературы).

Информация о соблюдении требований Нагойского протокола

Если работа связана с исследованиями, в которых в качестве объекта используются генетические ресурсы (растения, животные, микроорганизмы), полученные от зарубежных партнеров, необ-

ходимо дать ссылку на Международно признанный сертификат о соблюдении (Internationally Recognized Certificate of Compliance) Нагойского протокола к Конвенции о биологическом разнообразии, подтверждающий легальное получение данных ресурсов.

Информация о соблюдении биоэтических стандартов

Если работа связана с исследованиями, в которых в качестве объекта используются лабораторные животные, то необходимо указать, соблюдались ли международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных.

Если в качестве объектов исследования выступает человек, то необходимо указать:

- соответствуют ли процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, этическим стандартам институционального и/или национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики;
- получено ли от каждого из включенных в исследование участников информированное добровольное согласие.

В конце статьи по желанию авторов приводится следующая справочная информация

Общая информация о помощи в проведении работы и подготовке статьи: сообщения о предоставлении материалов, данных, компьютерного обеспечения, приборов во временное пользование; информация о проведении исследований в центрах коллективного пользования; помощь в технической подготовке текста; а также все прочее, что оценивается как полезная помощь. Информация о грантах и другой финансовой поддержке исследований. Авторы не должны использовать сокращенные названия институтов и спонсирующих организаций.

8. Список использованных источников

Оформляется в соответствии с приказом Высшей аттестационной комиссии Республики Беларусь от 25 июня 2014 г. № 159. Источники должны быть представлены в виде списка в порядке упоминания ссылок в тексте статьи. Нумерация — автоматическая.

Не допускаются ссылки на работы, которых нет в списке литературы, а также на неопубликованные материалы. В список использованных источников преимущественно следует включать работы не старше 10 лет (исключение составляют редкие высокоинформативные материалы).

9. На английском языке повторяются п. 2–6

10. Дата поступления статьи

К статье прилагаются:

1. Акт экспертизы о возможности опубликования в открытой печати.

2. Сопроводительное письмо, в структуре которого должны содержаться сведения о том, что:
– рукопись не находится на рассмотрении в другом издании;
– не была ранее опубликована.

Авторы несут ответственность за достоверность представленных в рукописи материалов.

3. Краткие сведения о каждом из авторов, включающие ФИО (полностью), год рождения, служебный адрес, адрес электронной почты, ученую степень, ученое звание, должность. Сведения об авторах предоставляются отдельным документом.

Бумажный экземпляр статьи подписывается всеми авторами.

Статья (в двух экземплярах) и сопроводительные документы представляются лично либо по почте на адрес: ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь. Электронная копия материалов направляется на электронный адрес: redactor@igc.by.

Редакция оставляет за собой право в процессе редакционной подготовки сокращать и исправлять рукопись по согласованию с автором.

Научное издание

МОЛЕКУЛЯРНАЯ И ПРИКЛАДНАЯ ГЕНЕТИКА

СБОРНИК НАУЧНЫХ ТРУДОВ

Том 28

Ответственный за выпуск *А. Л. Богданова*
Переводчик *М. Г. Пыжова*

Подписано в печать 12.11.2020. Формат 60×84^{1/8}. Бумага офсетная. Гарнитура Times.
Печать цифровая. Усл. печ. л. 13,95. Уч.-изд. л. 8,81. Тираж 100 экз. Заказ № 1615.

Отпечатано в типографии общества с ограниченной ответственностью «Киви групп».
223051, Минский район, а/г Колодищи, ул. Минская, 5/108.

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