

ISSN 1999-9127

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

МОЛЕКУЛЯРНАЯ И ПРИКЛАДНАЯ ГЕНЕТИКА

**СБОРНИК НАУЧНЫХ ТРУДОВ
ТОМ 33**

Издается с 2005 года
Выходит два раза в год

Минск
2022

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, 2022. – Т. 33. – 155 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, 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, Н. И. Дубовец, В. В. Титок, И. П. Шейко,
О. Н. Харкевич — члены редколлегии;
Е. М. Селихова — ответственный секретарь.

СОДЕРЖАНИЕ

<i>Н. В. Савина, С. В. Кубрак, Л. В. Милько, А. В. Кильчевский</i> Анализ последовательностей <i>ITS</i> -района рибосомной ДНК для идентификации редких видов семейства <i>Ranunculaceae</i>	7
<i>В. А. Лемеш, В. Н. Кипень, Г. В. Мозгова, Л. В. Хотылёва</i> Вариация числа копий участков ДНК, ассоциированных с холодоустойчивостью, для растений семейства <i>Brassicaceae</i>	18
<i>Т. А. Ганеева</i> Сравнительный анализ эффективности методик регенерации из эксплантов растений рапса сортов Магнат и Лидер	31
<i>Т. Г. Курьянчик, Н. В. Козел</i> Экспрессия генов и содержание структурных белков фотосистем в листьях ячменя в условиях почвенной засухи	38
<i>А. М. Шишлова-Соколовская, Е. П. Хмилевская, О. Ю. Урбанович</i> Разработка CRISPR/Cas9 системы для геномного редактирования гена <i>NtPDS</i> табака (<i>Nicotiana Tabacum</i>)	47
<i>А. Н. Верчук, С. В. Кубрак, А. В. Кильчевский</i> Сравнительное изучение методов предобработки пыльцы растений для получения качественных образцов ДНК	58
<i>А. М. Нестюк, С. В. Пантелеев, В. А. Ярмолович, О. Ю. Баранов</i> Изучение полиморфизма STS-маркеров изолятов корневой губки, инфицирующих ель европейскую (<i>Picea abies</i> (L.) H.Karst.) в Беларуси	67
<i>M. A. Vinter, I. S. Kazlouski, A. I. Zinchenko</i> Construction of a bacterial strain forming inclusion bodies, exhibiting diadenylate cyclase activity	76
<i>А. А. Муратова, О. В. Евдокимова, М. Н. Мандрик-Литвинкович, Л. Н. Валентович, М. А. Туток</i> Молекулярно-генетический и функциональный анализ генов, влияющих на синтез пиовердина бактериями <i>Pseudomonas brassicacearum</i> S-1	83
<i>Е. А. Хотько, А. Д. Таганович, А. Г. Кадушкин</i> Изучение полиморфизмов rs2234693 гена <i>ESR1</i> и rs731236 гена <i>VDR</i> у пациентов с хронической обструктивной болезнью легких	95
<i>Е. Л. Романишко, А. И. Киреева, М. Е. Михайлова, Р. И. Шейко</i> Выявление генетического дефекта дупликация развития (DD) в белорусской популяции абердин-ангусского скота	102

А. Н. Михалюк, Л. А. Танана

Ассоциация комплекса полиморфных вариантов генов *DGAT1*, *GH*, *PRL* и *BLG*
с показателями молочной продуктивности коров красной белорусской породной группы 109

Е. И. Машков, Е. С. Гайдученко

Генетическое разнообразие восточноевропейской полевки (*Microtus rossiaemeridionalis*)
в Беларуси..... 119

В. В. Карманова, Т. Г. Шабашова, М. Г. Синявская, Ю. Г. Гигиняк

Молекулярно-биологическое исследование микромицетов служебно-жилых модулей
станций «Гора Вечерняя» и «Мирный» (Восточная Антарктида)..... 129

О. М. Люсиков, И. С. Гордей, В. Е. Шимко, О. С. Матиевская, С. И. Гордей, И. В. Сацюк

Молекулярно-генетические аспекты устойчивости озимой пшеницы (*Triticum* L.)
к низкотемпературному стрессу 137

CONTENTS

<i>N. V. Savina, S. V. Kubrak, L. V. Milko, A. V. Kilchevsky</i> Analysis of <i>ITS</i> region sequences of ribosomal DNA for the identification of rare <i>Ranunculaceae</i> species	7
<i>V. A. Lemesh, V. N. Kipen, G. V. Mozgova, L. V. Khotyleva</i> Variation in the copy number of DNA regions for the <i>Brassicaceae</i> family associated with cold resistance.....	18
<i>T. A. Gapeeva</i> Comparative analysis of the efficiency of the methods of regeneration from rapeseed explants of Magnat and Leader varieties	31
<i>T. G. Kuryanchyk, N. V. Kozel</i> Gene expression and the content of structural proteins of photosystems in barley leaves under soil drought	38
<i>A. M. Shishlova-Sokolovskaya, E. P. Khmilevskaya, O. Yu. Urbanovich</i> Development of the CRISPR/Cas9 system for the genome editing of the <i>NtPDS</i> gene of tobacco (<i>Nicotiana Tabacum</i>)	47
<i>A. N. Viarchuk, S. V. Kubrak, A. V. Kilchevskiy</i> Comparative study of pollen pretreatment methods to obtain qualitative DNA samples	58
<i>A. M. Nestyuk, S. V. Panteleev, V. A. Yarmolovich, O. Yu. Baranov</i> Studying the polymorphism of STS-markers to root fungus isolates infecting the european spruce (<i>Picea abies</i> (L.) H.Karst.) in Belarus.....	67
<i>М. А. Винтер, И. С. Казловский, А. И. Зинченко</i> Создание штамма бактерий, образующих тельца включения, проявляющих диаденилатциклазную активность	76
<i>A. A. Muratova, O. V. Evdokimova, M. N. Mandryk-Litvinkovich, L. N. Valentovich, M. A. Titok</i> Molecular genetic and functional analysis of genes influencing pyoverdine synthesis in <i>Pseudomonas brassicacearum</i> S-1	83
<i>E. A. Khotko, A. D. Taganovich, A. G. Kadushkin</i> Study of the polymorphisms rs2234693 of the <i>ESR1</i> gene and rs731236 of the <i>VDR</i> gene in patients with chronic obstructive pulmonary disease	95
<i>E. L. Ramanishka, M. E. Mikhailova, A. I. Kireyeva, R. I. Sheyko</i> Identification of the genetic defect of developmental duplication (DD) in the belarusian population of aberdeen angus cattle	102
<i>A. N. Mikhaliuk, L. A. Tanana</i> Association between the complex of polymorphic variants of <i>DGAT1</i> , <i>GH</i> , <i>PRL</i> and <i>BLG</i> genes and milk yield indicators of the cows of the belarusian red breed group.....	109
<i>E. I. Mashkov, H. S. Gajduchenko</i> Genetic diversity of the east european vole (<i>Microtus rossiaemeridionalis</i>) in Belarus	119

<i>V. V. Karmanova, T. G. Shabashova, M. G. Sinyavskaya, Yu. G. Giginyak</i> Molecular biological study of micromycetes at service and living modules of the stations "Mount Vechernyaya" and "Mirny" (East Antarctica).....	129
<i>O. M. Lyusikov, I. S. Gordej, V. E. Shymko, O. S. Matievskaja, S. I. Gordej, I. V. Satsuk</i> Molecular-genetic aspects of winter wheat (<i>Triticum</i> L.) resistance to low-temperature stress	137

Н. В. Савина, С. В. Кубрак, Л. В. Милько, А. В. Кильчевский

АНАЛИЗ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ *ITS*-РАЙОНА РИБОСОМНОЙ ДНК ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ РЕДКИХ ВИДОВ СЕМЕЙСТВА *RANUNCULACEAE*

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

Продемонстрирована эффективность использования *ITS*-района в качестве ДНК-штрихкода для генетической идентификации растений редких и охраняемых видов семейства Лютиковые (*Ranunculaceae*), включенных в Красную Книгу Республики Беларусь. Методом ДНК-штрихкодирования с использованием как *ITS*-района, так и более компактного межгенного спейсера *ITS2*, показано, что 11 видов семейства *Ranunculaceae*, относящихся к 2 подсемействам и 7 родам, хорошо различимы на молекулярном уровне. Филогенетическое взаимоотношение 11 исследуемых видов, построенное на основании нуклеотидной вариабельности *ITS*-района, полностью согласуется с существующей таксономией этого семейства, основанной на морфологических и цитологических особенностях. Полученные результаты позволяют рассматривать участок *ITS2* в качестве мини-штрихкода для быстрой или дополнительной видоидентификации.

Ключевые слова: биоразнообразие, Лютиковые, *Ranunculaceae*, ДНК-штрихкодирование, *ITS*-район, *ITS2*.

Введение

Мониторинг занесенных в Красную книгу Республики Беларусь видов растений и грибов является одним из важнейших направлений государственной политики в области охраны окружающей среды и обеспечивается за счет функционирования Национальной системы мониторинга окружающей среды [1]. Сбор, обобщение, анализ, хранение и накопление различных типов информации (литературной, фондовой, ведомственной и др.) об объектах растительного мира и среде их произрастания являются важными задачами подобного наблюдения. На основе полученных данных строятся прогнозы динамики растительного мира, помогающие в решении проблем сохранения биологического разнообразия, обеспечения его устойчивого состояния и рационального использования ресурсов [1–2]. Информация о генетическом разнообразии является необходимой составляющей знаний о состоянии окружающей среды, а ее накоплением и хранением занимается ряд научных учреждений Республики Беларусь. Деятельность Республиканского банка ДНК человека, растений, животных и микроорганизмов наряду со сбо-

ром и депонированием генетического материала сельскохозяйственных растений направлена на сохранение и изучение генофонда диких видов растений, произрастающих на территории Беларуси. ДНК-идентификация редких растений дает возможность исключить случаи неверного определения вида и может быть полезна при уточнении таксономического статуса образцов с конкретных территорий.

Семейство Лютиковые (*Ranunculaceae*) занимает одно из центральных мест в системе покрытосеменных, включая в себя около 60 родов и свыше 2 000 описанных видов [3]. Большинство представителей семейства предпочитают умеренный и прохладный климат Северного полушария, до арктической области включительно. Значительное число видов обитает и в тропическом поясе, в основном в высокогорных районах. Основная масса видов — это растения, связанные с условиями достаточного и отчасти избыточного увлажнения или избыточного увлажнения в начале вегетационного периода.

Растения из семейства Лютиковых представляют интерес в качестве потенциального лекарственного сырья: с использованием фито-

химических методов исследований доказано наличие в них большого количества биологически активных соединений с широким спектром фармакологических свойств, в первую очередь дитерпеновых алкалоидов, кумаринов и сапонинов. В народной медицине стран Восточной Азии давно используются антиаритмические, анестезирующие, противовоспалительные, психостимулирующие, спазмолитические и другие свойства представителей семейства. Отдельные представители рода Акониит и рода Живокость стали основой для получения препаратов конвенциональной медицины — антиаритмического Аллапинина и Мелликтинина, используемого при неврологических заболеваниях [4]. В то же время функции большинства соединений специализированного обмена, синтезируемых растениями семейства Лютиковые, до настоящего времени изучены недостаточно.

Семейство *Ranunculaceae* — одно из самых крупных по количеству и разнообразию видов, что создает трудности при выяснении родственных отношений среди подсемейств и их филогении. Для становления систематики семейства были использованы анатомо-морфологические исследования, данные по кариотипам, изучение ядерной 26S рибосомальной ДНК, серологические подходы. Дополнительно привлекались биохимические и медико-фармацевтические свойства. Кроме того, для установления статуса отдельных таксономических групп внутри *Ranunculaceae*, оказалось полезно применение методов молекулярной генетики [3].

В базе данных Центрального Ботанического сада НАН Беларуси к настоящему времени содержится информация о 52 видах и внутривидовых таксонах семейства [5], произрастающих на территории нашей страны. В Красную книгу Республики Беларусь [6] внесено 11 видов семейства Лютиковые I–IV категорий природоохранной значимости и 10 видов, нуждающихся в профилактической охране.

Цель нашего исследования — генетическая идентификация видовой принадлежности образцов растительного материала редких охраняемых видов семейства Лютиковые (*Ranunculaceae*) методом ДНК-штрихкодирования и пополнение региональной библиотеки ДНК-штрихкодов дикорастущих растений белорусской флоры.

Материалы и методы

Материал для исследования депонирован в Республиканском банке ДНК в коллекции редких и находящихся под угрозой исчезновения видов растений. Отбор, подготовка и фиксация биологического материала выполнены сотрудниками Института экспериментальной ботаники им. В. Ф. Купревича НАН Беларуси и Национального парка Нарочанский. Для каждого вида растений, помещенного на хранение, проведен маркер-специфический анализ ДНК по четырем локусам: *ITS2*, *rbcL*, *psbA-trnH* и *matK*.

Общую геномную ДНК выделяли из высушенной в силикагеле растительной ткани с использованием коммерческого набора *DNeasy Plant Mini Kit* (Qiagen, Германия) согласно протоколу производителя; оценку качества выделенной ДНК проводили спектрофотометрически (коэффициент $OD_{260/280}$).

Аmplификацию маркерных участков ДНК (*rbcL*, *psbA-trnH*, *matK* и *ITS*) проводили с помощью специфических праймеров [7]. Для *ITS* использовали пару *ITS_S2F* / *ITS_S3R*, которая обеспечивает амплификацию не только межгенного спейсера *ITS2*, но частично и фрагментов соседних с ним участков 5.8S и 28S, т. н. *ITS*-район (5.8S–*ITS2*–28S). ПЦР проводили в финальном объеме 8 мкл; смесь для амплификации включала готовый буфер для проведения ПЦР *Quick-load Taq 2X Master Mix* (ОДО «Праймтех», Беларусь), прямой и обратный праймеры в конечной концентрации 0,3 пмоль/мкл и ddH₂O. Вносили 1 мкл матрицы ДНК в концентрации 10 нг/мкл. Амплификацию проводили в термоциклере *C1000 Touch Thermal Cycler* (BioRad, США). Результаты амплификации проверяли в 1,5% агарозном геле. Последовательности праймеров для амплификации целевых продуктов и размеры ожидаемых фрагментов приведены в таблице 1.

Продукты амплификации очищали с помощью ферментов *Exonuclease I* и *Shrimp Alkaline Phosphatase* (Thermo Fisher Scientific, США) согласно рекомендациям производителя. Терминирующую реакцию проводили с использованием коммерческого набора *Brilliant Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Nimagen, Нидерланды) с последующей очисткой продукта реакции этанолом. Опре-

Таблица 1

Праймеры для амплификации маркерных последовательностей ДНК-штрихкодов

ДНК-штрихкод	Последовательность праймеров (прямой / обратный)	Ожидаемый размер ПЦР продукта, п. о.
<i>psbA-trnH</i>	<i>psbA3_F</i> 5'-GTTATGCATGAACGTAATGCTC-3' <i>trnHf_05</i> 5'-CGCGCATGGTGGATTACACAATCC-3'	~350–400 п. н.
<i>rbcL</i>	<i>rbcLaF</i> 5'-ATGTCACCACAAACAGAGACTAAAGC-3' <i>rbcLaR</i> 5'-GTAAAATCAAGTCCACCGCG-3'	~500–900 п. н.
<i>ITS</i> -район	<i>ITS_S2F</i> 5'-ATGCGATACTTGGTGTGAAT-3' <i>ITS_S3R</i> 5'-GACGCTTCTCCAGACTACAAT-3'	~600 п. н.
<i>matK</i>	<i>matK-xF</i> 5'-TAATTTACGATCAATTCATTC-3' <i>MALPR1</i> 5'-GTTCTAGCACAAAGAAAGTCG-3'	~740–800 п. н.

деление нуклеотидной последовательности проводили на автоматическом генетическом анализаторе *ABI 3500 DNA Analyzer* (Applied Biosystems, США). Для одного вида выполнен анализ в трех повторностях (три индивидуальных растения), для каждого ДНК-штрихкода получено четыре хроматограммы: три прямого и одна обратного прочтения. Хроматограммы сиквенсов проанализированы в *Sequence Scanner 1.0.*, с помощью модуля *ContigExpress Project* проведено выравнивание индивидуальных последовательностей каждого растения для получения результирующей (консенсусной) маркерной последовательности вида. Полученные консенсусные последовательности сравнивали с последовательностями в международных базах данных *NCBI BLAST* (Basic Local Alignment Search Tool) [8] и *BOLD* (Barcode of Life Data Systems) [9]. Выявление в *NCBI* нуклеотидной последовательности известного биологического вида, на 98–100% совпадающей с анализируемой, являлось подтверждением видовой принадлежности изучаемого нами растения. Множественное выравнивание последовательностей и построение дендрограмм проводили с помощью программы *MEGA 4*, дендрограммы строили на основе матрицы попарных генетических расстояний методом ближайшего соседа *Neighbour-Joining*.

Результаты и обсуждение

Лютиковые, будучи крупным семейством по количеству описанных видов, имеют разнообразную систематику, претерпевшую многочисленные изменения, начиная с XIX века. Первоначально создание филогенетической системы опиралось исключительно на морфологические признаки, позже стали учитывать цитологические критерии, в частности, внешний вид хромосом — изгибаемые *R(anunculus)* и изогнутые *T(halictrum)*, что послужило основой деления на подсемейства. Последующие варианты систематики Лютиковых учитывали жизненные формы представителей семейства, кариотип, особенности формирования плодов и др. В настоящее время существующая систематика семейства *Ranunculaceae* уточняется с помощью методов молекулярной биологии [3,10].

В данной работе использован биологический материал 11 представителей семейства *Ranunculaceae*, произрастающих на территории Беларуси и имеющих различный охранный статус (табл. 2): Борец обыкновенный (*Aconitum lycostomum* L.) относится к I-й категории национальной природоохранной значимости (CR — находящиеся на грани исчезновения); Борец шерстистостылый (*Aconitum lasiostomum* Reichenb.), Ломонос прямой (*Clematis recta* L.) и Равноплодник василистниковый (*Isopyrum thalictroides*

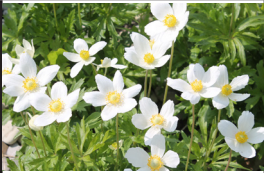
L.) — ко II-й категории (EN — угрожаемые / исчезающие); Живокость высокая (*Delphinium elatum* L.) и Шелковник Кауфмана (*Batrachium kauffmannii* (Clerc) V. Krecz.) — к III-й (VU — уязвимые); Ветреница лесная (*Anemona sylvestris* L.), Прострел луговой (*Pulsatilla pratensis* (L.) Mill.), Прострел раскрытый (*Pulsatilla patens* (L.) Mill.) относятся к IV-й категории охраны (NT — потенциально уязвимые) [6]. Ветреница дубравная

(*Anemone nemorosa* L.) и Прострел обыкновенный (*Pulsatilla vulgaris* Mill.) находятся в списке видов, нуждающихся в профилактической охране.

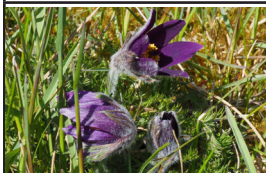
Результаты поиска референсных видовых последовательностей *ITS*, *rbcL*, *psbA-trnH* и *matK* для изучаемых нами Лютиковых в международных базах данных показали, что для большинства видов информация представлена достаточно полно (табл. 2). Однако для от-

Таблица 2

Редкие виды семейства Лютиковые (*Ranunculaceae*), депонированные в Республиканский банк ДНК, и результаты ДНК-штрихкодирования

Фото***	Вид	ДНК-штрихкод							
		ITS-район		<i>rbcL</i>		<i>psbA-trnH</i>		<i>matK</i>	
		п. н.*	%**	п. н.	%	п. н.	%	п. н.	%
	Борец обыкновенный <i>Aconitum lycoctonum</i>	435	98,9	543	99,5	247	100	472	92
	Борец шерстистоустый <i>Aconitum lasiostomum</i>	392	99,6	545	—	нет	—	691	—
	Ветреница дубравная <i>Anemone nemorosa</i>	456	90	549	99,8	273	—	829	99,3
	Ветреница Лесная <i>Anemona sylvestris</i>	453	100	554	99,6	281	—	449	—
	Живокость высокая <i>Delphinium elatum</i>	409	100	531	100	265	100	812	98,9

Окончание таблицы 2

Фото***	Вид	ДНК-штрихкод							
		ITS-район		rbcL		psbA-trnH		matK	
		п. н.*	%**	п. н.	%	п. н.	%	п. н.	%
	Ломонос Прямой <i>Clematis recta</i>	383	100	552	99,8	195	97,1	719	—
	Прострел Луговой <i>Pulsatilla pratensis</i>	445	98,1	543	100	320	99,7	802	—
	Прострел обыкновенный <i>Pulsatilla vulgaris</i>	287	92	543	99,5	312	99,7	724	99,8
	Прострел раскрытый <i>Pulsatilla patens</i>	299	99,7	525	100	352	100	нет	—
	Равноплодник василистниковый <i>Isopyrum thalictroides</i>	445	99,8	541	99,8	210	—	777	99,7
	Шелковник Кауфмана <i>Batrachium kauffmannii</i>	245	98	539	—	393	—	нет	—

Примечание. *п. н. — длина маркерной последовательности; **% — эффективность видоидентификации; *** — фото растений доступны на сайтах <http://plantcadastre.by/index.php>; <http://hbc.bas-net.by/plantae/> и <http://belpriroda.mrsanuch.ru>; «—» — последовательность отсутствует в базах данных NCBI и BOLD; «нет» — сиквенсы авторами не получены

дельных видов такая информация отсутствует: для Шелковника Кауфмана (*Batrachium kauffmannii*) представлена лишь ядерная последовательность *ITS*; для Ветреницы лесной (*Anemona sylvestris*) — информация о последовательностях *ITS* и *rbcL*. Отсутствие референсных последовательностей в международных

базах данных, с одной стороны, затрудняет сравнение полученных результатов с верифицированными источниками, но, с другой стороны, самостоятельно полученные нуклеотидные последовательности пополняют региональную библиотеку ДНК-штрихкодов дикорастущих растений белорусской флоры.

В результате работы для 11 представителей семейства *Ranunculaceae* получена 41 консенсусная последовательность по четырем филогенетически значимым ДНК-штрихкодам (табл. 2). Наибольший интерес для генетической идентификации видовой принадлежности растений семейства Лютиковые представляют последовательности внутренних транскрибируемых спейсеров генов рРНК, которые считаются весьма эффективными для установления таксономической структуры и уточнения филогенетических связей. Согласно недавним исследованиям, область спейсера *ITS1-5.8S-ITS2* рибосомного оперона успешно используется для идентификации растений как на межвидовом, так и на внутривидовом уровнях [11–13]. Данные о последовательностях внутреннего транскрибируемого ядерного спейсера *ITS* легли в основу построения филогенетического дерева 92 видов растений семейства Лютиковых в работе Y. Cai и соавт [14]; аналогичные данные представлены

в работе И. Ю. Евдокимова [15], где филогенетическое дерево построено на основе области рибосомного оперона *ITS1-5.8S-ITS2* для 46 представителей *Ranunculaceae*.

В данной работе с целью генетической идентификации видов и проведения филогенетического анализа проанализирована последовательность *ITS*-района 11 представителей семейства Лютиковых. Протяженность выравненных и используемых для анализа последовательностей *ITS*-района у изучаемых растений составляла 245–456 п. н. (табл. 2). Используемые в работе праймеры обеспечивают амплификацию межгенного спейсера *ITS2* (размер которого у покрытосеменных составляет около 220–240 п. н.) и частично участков генов *5.8S* и *28S* (рис. 1).

Выбор *ITS*-района в качестве филогенетического маркера удобен тем, что у растений именно ядерные гены наиболее вариабельны, особенно некодирующие области интронов, а также спейсеры между тандемно повторяю-

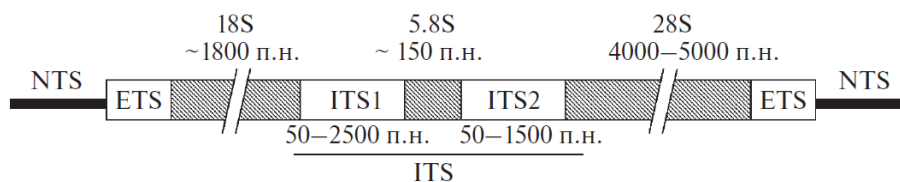


Рис. 1. Схема строения структурной единицы кластера рРНК [16]

18S, *5.8S*, *28S* — гены рРНК; *ITS1* и *ITS2* — внутренние транскрибируемые спейсеры; *ETS* — внешние транскрибируемые спейсеры; *NTS* — нетранскрибируемый спейсер, разделяющий структурные единицы кластера рРНК

щимися генами, как в кластерах рибосомальной РНК. Сами гены рибосомальной РНК состоят из чередующихся консервативных и вариабельных участков, что позволяет использовать для их изучения универсальные праймеры [17]. Рибосомы эукариот включают в себя четыре функциональных рРНК: *28S*, *18S*, *5.8S* и *5S*. Первые три гена транскрибируются в виде одной молекулы, состоящей из генов, окруженных внешними (*ETS*, external transcribed spacers) и внутренними (*ITS*, internal transcribed spacers) спейсерами, которая затем разрезается на отдельные рРНК (рис. 1).

В базах данных *NCBI* приводятся суммарные размеры нескольких участков *ITS*-района (*ITS1* / *5.8S* / *ITS2* / *28S*) в различных вариациях, что облегчает поиск аналоговых видовых

последовательностей. В таблице 3 приведены данные о размерах ядерных маркерных последовательностей, полученные в ходе выполнения анализа.

Нами получено 33 последовательности *ITS*-района для 11 анализируемых видов. В результате выравнивания индивидуальных последовательностей сгенерировано 11 результирующих видовых (табл. 4). Полученная информация в формате FASTA включена в региональную библиотеку ДНК-штрихкодов дикорастущих растений белорусской флоры. В таблице 4 видовые последовательности представителей семейства Лютиковых приведены в виде двумерных QR-кодов (Quick Response Code, код быстрого реагирования).

При проведении филогенетического анализа в качестве референсных нами взяты видовые

Таблица 3

Длина маркерных последовательностей *ITS*-района у видов семейства Лютиковые (*Ranunculaceae*)

№ п/п	Вид	Размер ДНК-штрихкода (п. н.)	
		<i>ITS</i> -район	<i>ITS2</i> *
1	Борец обыкновенный / <i>Aconitum lycoctonum</i>	435	245
2	Борец шерстистоустый / <i>Aconitum lasiostomum</i>	392	220
3	Ветреница дубравная / <i>Anemone nemorosa</i>	456	225
4	Ветреница лесная / <i>Anemona sylvestris</i>	453	216
5	Живокость высокая / <i>Delphinium elatum</i>	409	220
6	Ломонос прямой / <i>Clematis recta</i>	383	244
7	Прострел луговой / <i>Pulsatilla pratensis</i>	445	219
8	Прострел обыкновенный / <i>Pulsatilla vulgaris</i>	287	**
9	Прострел раскрытый / <i>Pulsatilla patens</i>	299	**
10	Равноплодник василистниковый / <i>Isopyrum thalictroides</i>	445	217
11	Шелковник Кауфмана / <i>Batrachium kauffmannii</i>	245	**

Примечание. *последовательность участка *ITS2* определена с помощью ресурса <http://its2.bioapps.biozentrum.unizuerzburg.de/>; **получен неполноразмерный участок *ITS2*

Таблица 4

Результирующие последовательности *ITS*-района представителей 11 видов редких растений семейства Лютиковые (*Ranunculaceae*)

Вид растения	QR-код	Вид растения	QR-код	Вид растения	QR-код
<i>Anemona sylvestris</i>		<i>Batrachium kauffmannii</i>		<i>Pulsatilla vulgaris</i>	
<i>Anemone nemorosa</i>		<i>Clematis recta</i>		<i>Pulsatilla patens</i>	

Окончание таблицы 4

Вид растения	QR-код	Вид растения	QR-код	Вид растения	QR-код
<i>Aconitum lasiostomum</i>		<i>Delphinium elatum</i>		<i>Pulsatilla pratensis</i>	
<i>Aconitum lycoctonum</i>		<i>Isopyrum thalictroides</i>			

аналоговые последовательности *ITS*-района из международной базы данных *NCBI BLAST*, в качестве внешней группы использована последовательность *ITS*-района *Iris sibirica* (семейство Ирисовые) (табл. 5). Из анализа при выравнивании исключены последовательности концевых участков исследуемого нами *ITS*-района с целью избежания ошибок

секвенирования околопраймерных областей.

Множественное выравнивание последовательностей участков *ITS* ядерного генома 11 видов семейства Лютиковых позволило оценить различия на межвидовом уровне. Среди 435 сайтов выявлено 189 переменных позиций, из которых 93 — парсимонически-информативные. На рисунке 2 представлены дан-

Таблица 5
Референсные последовательности *ITS*-района отдельных видов семейства Лютиковые (*Ranunculaceae*)

Вид	Код последовательности в NCBI
<i>Anemona sylvestris</i>	KJ819803.1
<i>Anemone nemorosa</i>	KX167066.1
<i>Pulsatilla patens</i>	MG237345.1
<i>Trollius europaeus</i>	AY148270.1
<i>Pulsatilla vulgaris</i>	MK341851.1
<i>Batrachium kauffmannii</i>	MG098949.1
<i>Clematis recta</i>	GU732622.1
<i>Pulsatilla pratensis</i>	MN997015.1
<i>Cimicifuga europae</i>	Z98286.1
<i>Isopyrum thalictroides</i>	GU257977.1
<i>Aconitum lycoctonum</i>	AF216546.1
<i>Aconitum lasiostomum</i>	AF216534.1
<i>Delphinium elatum</i>	MT137602.1
<i>Iris sibirica</i>	MF543721.1

ные о генетическом взаимоотношении между видами в пределах семейства *Ranunculaceae*.

Согласно современной классификации, семейство Лютиковые (*Ranunculaceae*) включает 5 подсемейств: *Hydrastidoideae*, *Coptidoideae*, *Helleboroideae*, *Thalictrioideae*, *Ranunculoideae* и насчитывает около 60 родов [18]. Изучаемые нами виды редких растений семей-

ства Лютиковых принадлежат к двум подсемействам. Подсемейство *Ranunculoideae* является самым крупным в таксоне по количеству видов и представлено в нашей коллекции 6 родами: род Ветреница (*Anemone*) — виды *A. sylvestris* и *A. nemorosa*; род Лютик, подрод Шелковник (*Ranunculus* subgen. *Batrachium*) представлен видом *B. Kauffmannii*;

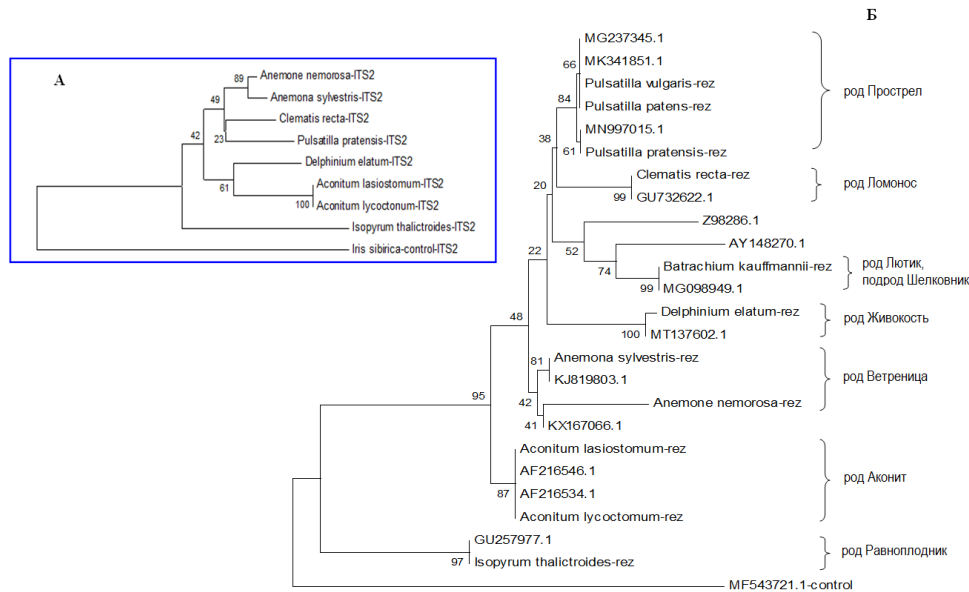


Рис. 2. Филогенетическое дерево, построенное на основе фрагментов *ITS*-района ядерной ДНК представителей семейства *Ranunculaceae*: А — дендрограмма, построенная на основе сравнения фрагментов *ITS2*; Б — дендрограмма, построенная на основе сравнения последовательностей *ITS*-района

к роду Прострел (*Pulsatilla*) относятся виды *P. patens*, *P. vulgaris*, *P. pratensis*; к роду Аконит (*Aconitum*) — виды *A. Lycopodium* и *A. lasiostomum*; род Живокость (*Delphinium*) — *D. elatum*; род Ломонос (*Clematis*) — *C. recta*. К подсемейству *Thalictrioideae* относится род Равноплодник (*Isopyrum*) — вид *I. thalictrioides*. Дендрограмма, построенная на основании нуклеотидной вариативности *ITS*-района (рис. 2Б), согласуется с принятой таксономией Лютиковых. Виды сгруппировались в 7 кластеров, соответствующие родам семейства. Последовательности из *NCBI* (табл. 5) при кластеризации заняли те же позиции, что и аналогичные образцы из нашего исследования, в соответствии с высоким процентом сходства между ними (табл. 2).

Дендрограмма на рисунке 2А представляет филогенетическую характеристику коллекции изучаемых редких видов на основе полноразмерных участков *ITS2* и демонстрирует раз-

деление на кластеры, аналогичное построению по вариативности последовательностей *ITS*-района. Таким образом, маркер *ITS2* отвечает всем необходимым требованиям к штрих-коду: (1) высококопийность; (2) успешная амплификация участка при малом количестве материала и даже у гербарных образцов; (3) высокое качество сиквенсов; (4) высокая разрешающая способность на межвидовом уровне. Этот участок ДНК можно использовать в качестве так называемого мини-штрихкода для быстрой или дополнительной идентификации видов. Мини-штрихкодирование ДНК может заполнить пробелы, оставленные другими методами в области молекулярной идентификации растений [19–21].

Заключение

Таким образом, использование *ITS*-района в качестве молекулярно-филогенетического маркера показало, что виды *Ranunculaceae* хо-

рошо различимы на молекулярном уровне. Параллельное использование морфологических и молекулярных методов позволяет более точно провести идентификацию растений и уточнить существующую систематику семейства Лютиковые. Аналогичные результаты можно получить, сравнивая не полноразмерный регион *ITS*, а только межгенный спейсер *ITS2*, что делает ДНК-маркер удобным для целей филогении и систематики.

Список использованных источников

1. Главный информационно-аналитический центр Национальной системы мониторинга окружающей среды Республики Беларусь (ГИ-АЦ НСМОС) [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.nsmos.by/content/177.html>. – Дата доступа: 20.06.2022.
2. Мониторинг растительного мира в Республике Беларусь: результаты и перспективы / И. В. Бордок [и др.]; науч. ред.: А. В. Пугачевский, А. В. Судник; Нац. акад. наук Беларуси, Ин-т эксперим. ботаники им. В. Ф. Купревича. – Минск: Беларуская навука, 2019. – 491 с. ISBN 978-985-08-2379-3.
3. Евдокимов, И. Ю. Молекулярная филогения семейства *Ranunculaceae* на основе *rbcL* и *trnL-F* последовательностей хлоропластной ДНК / И. Ю. Евдокимов // Проблемы ботаники Южной Сибири и Монголии: сб. науч. ст. по материалам XVI междунар. науч.-практ. конф. (Барнаул, 5–8 июня 2017 г.) / АГУ, Юж.-Сиб. ботан. сад, Алтайское отд-ние Рус. ботан. о-ва; ред.: А. И. Шмаков, Т. М. Копытина. – Барнаул: Изд-во АлтГУ, 2017. – С. 240–245.
4. Белых, О. А. Биологически активные вещества и полезные свойства представителей семейства *Ranunculaceae* Juss. (обзор) / О. А. Белых // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. – 2014. – № 5 (10). – С. 25–32.
5. Информационно-поисковая система Центрального ботанического сада Национальной Академии наук Беларуси [Электронный ресурс]. – Режим работы: <http://hbc.bas-net.by/plantae/>. – Дата доступа: 01.06.2022.
6. Красная книга Республики Беларусь: редкие и находящиеся под угрозой исчезновения виды дикорастущих растений / гл. редкол.: И. М. Качановский (предс.), М. Е. Никифоров, В. И. Парфенов [и др.]. – Мн.: «Беларуская Энцыклапедыя» імя Петруся Броўкі. – 2015. – 448 с. – ISBN 978-985-11-0843-1.
7. The Canadian Centre for DNA Barcoding http://ccdb.ca/site/wp-content/uploads/2016/09/CCDB_PrimerSets-Plants.pdf. CCDB [Electronic resource]: Canadian Centre for DNA Barcoding. – Mode of access: <http://ccdb.ca/>. – Date of access: 04.04.2022.
8. NCBI BLAST [Electronic resource]: National Center for Biotechnology Information, Basic Local Alignment Search Tool. – Mode of access: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. – Date of access: 04.04.2022.
9. BOLD Systems [Electronic resource]: The Barcode of Life Data Systems / CCDB (The Canadian Centre for DNA Barcoding). – Mode of access: http://ccdb.ca/http://boldsystems.org/index.php/Public_Primer_PrimerSearch. – Date of access: 04.04.2022.
10. Tamura, M. Angiospermae. Ordnung Ranunculales. Fam. Ranunculaceae. Systematic Part. II / M. Tamura. – Berlin. Duncker and Humbolt, 1995. – Vol. 17a, IV. – P. 223–519.
11. Authentication of Medicinal Herbs using PCR-Amplified *ITS2* with Specific Primers / S.-J. Chiou [et al.] // Planta Medica. – 2007. – Vol. 73, № 13. – P. 1 421–1 426. doi:10.1055/s-2007-990227.
12. Validation of the *ITS2* Region as a Novel DNA Barcode for Identifying Medicinal Plant Species / S. Chen [et al.] // PLoS ONE. – 2010. – Vol. 5, № 1. – e8613. doi:10.1371/journal.pone.0008613.
13. Кирьянов, П. С. Структурная организация генов *18S* и *28S* рибосомной РНК карельской березы / П. С. Кирьянов, О. Ю. Баранов // Молекулярная и прикладная генетика. – 2020. – Т. 28. – С. 46–56.
14. Molecular phylogeny of *Ranunculaceae* based on internal transcribed spacer sequences / Y. Cai [et al.] // African Journal of Biotechnology. – 2009. – Vol. 8, № 20. – P. 5 215–5 224.
15. Евдокимов, И. Ю. Обзор систем семейства *Ranunculaceae* Juss. в хронологической последовательности / И. Ю. Евдокимов // Проблемы ботаники Южной Сибири и Монголии: Сборник науч. ст. по материалам XIV междунар. науч.-практич. конф. – Барнаул: Изд-во АГУ. – 2015. – С. 140–144.
16. Молекулярные маркеры для видоидентификации и филогенетики растений / Т. В. Матвеева [и др.] // Экологическая гене-

тика. – 2011. – Т. IX, № 1. – С. 32–43.

17. Шнеер, В. С. ДНК-штрихкодирование – новое направление в сравнительной геномике растений / В. С. Шнеер // Генетика. – 2009. – Т. 45, № 11. – С. 1 436–1 448.

18. Molecular phylogeny of Ranunculaceae based on *rbc L* sequences / Y-F. Cai [et al.] // *Biologia*. – 2010. – Vol. 65, № 6. – P. 997–1003. DOI: 10.2478/s11756-010-0105-8.

19. DNA Mini-Barcoding: A Derived Barcoding Method for Herbal Molecular Identification / Z. Gao Z. [et al.] // *Front. Plant Sci.* – 2019. –

Vol. 10. – Article 987, P. 1–11. doi: 10.3389/fpls.2019.00987.

20. Species identification of poisonous medicinal plant using DNA barcoding / M. Liu [et al.] // *Chin J Nat Med.* – 2019. – Vol. 17, № 8. – P. 585–590.

21. Using the *ITS2* sequence-structure as a DNA mini-barcode: A case study in authenticating the traditional medicine “Fang Feng” / W. Zhang [et al.] // *Biochemical Systematics and Ecology*. – 2016. – Vol. 69. – 188e194 doi: 10.1016/j.bse.2016.10.007.

N. V. Savina, S. V. Kubrak, L. V. Milko, A. V. Kilchevsky

ANALYSIS OF *ITS* REGION SEQUENCES OF RIBOSOMAL DNA FOR THE IDENTIFICATION OF RARE *RANUNCULACEAE* SPECIES

State Scientific Institution

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

27 Akademicheskaya St., 220072 Minsk, Republic of Belarus

e-mail: N.Savina@igc.by

The effectiveness of using of the *ITS* region as a DNA barcode for the genetic identification of plants of rare and protected species of *Ranunculaceae* included in the Red Book of the Republic of Belarus was demonstrated. The DNA barcoding technique allowed, using both the *ITS* region and a more compact intergenic spacer *ITS2*, demonstrating that 11 *Ranunculaceae* species belonging to two subfamilies and seven genera are clearly distinguishable at the molecular level. The phylogenetic relationship between eleven studied species built on the basis of the nucleotide variability of the *ITS* region is fully consistent with the existing taxonomy of this family based on morphological and cytological features. The results obtained make it possible to consider the *ITS2* region as a mini barcode for rapid or additional identification.

Keywords: biodiversity, *Ranunculaceae*, DNA barcoding, *ITS* region, *ITS2*.

Дата поступления в редакцию: 05 сентября 2022 г.

В. А. Лемеш, В. Н. Кипень, Г. В. Мозгова, Л. В. Хотылёва

ВАРИАЦИЯ ЧИСЛА КОПИЙ УЧАСТКОВ ДНК, АССОЦИИРОВАННЫХ С ХОЛОДОУСТОЙЧИВОСТЬЮ, ДЛЯ РАСТЕНИЙ СЕМЕЙСТВА *BRASSICACEAE*

Государственное научное учреждение

«Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси»

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

e-mail: V.Lemesh@igc.by

Определено относительное число копий (CNV) на геном по пяти генетическим маркерам BnGMS180, BrGMS102, BrgMS372, BrGMS4511 и SSR0110, ассоциированных с устойчивостью к пониженным температурам и морозостойкостью, для 51 сорта культурных растений семейства *Brassicaceae* с широким ареалом возделывания. Показано, что наибольшим спектром вариаций значения CNV обладает генетический маркер BnGMS180, диапазон значений варьировал от 0,48 (сорт рапса Мартын, Беларусь) до 12,61 (сорт брюквы Sutton's Favorite, Швеция). Для остальных генетических маркеров вариация значения CNV незначительна.

Ключевые слова: CNV, Copy Number Variation, число копий участков ДНК, *Brassicaceae*, генетические маркеры, холодоустойчивость.

Введение

Культурные сорта растений семейства *Brassicaceae* прошли долгую историю одомашнивания, поэтому некоторые его разновидности характеризуются высокой устойчивостью к пониженным температурам и морозостойкостью. Показано, что устойчивость к пониженным температурам тесно связана с процессами, происходящими в клеточных мембранах растений, изменением синтеза ферментов и активизацией физиологически активных систем защиты растений [1–3]. Известно, что в формировании толерантности к пониженным температурам и морозостойкости задействовано множество генов, запускающих ответ на стрессовые воздействия [4–7].

Несмотря на большой прогресс в исследовании молекулярных механизмов ответа на холодовое воздействие и выявлении локусов ключевых факторов транскрипции и эффекторных генов на модельном объекте *A. thaliana*, разработано немного молекулярных маркеров, которые выявляют полиморфизм генов и локусов количественных признаков, ассоциированных с холодо- и морозостойкостью, у представителей семейства *Brassicaceae*. Это связано с тем, что не все ге-

ны сложной транскрипционной регуляторной сети могут быть напрямую ассоциированы с фенотипическим признаком.

Например, у вида *B. rapa* выявлены только несколько генов, участвующих в формировании ответа на пониженные температуры [6, 8, 9] и практически нет сообщений по картированию генов, участвующих в формировании холодостойкости и морозостойкости. Также единичными являются работы по поиску ДНК-маркеров, сцепленных с генами COR (cold-regulated) у вида *B. rapa*, и их использования для исследования хозяйственно-ценных разновидностей данного вида.

Роль вариации числа копий локусов (CNV, Copy Number Variation), ассоциированных с устойчивостью к пониженным температурам и морозостойкостью, изучалась для множества видов культурных растений [10–14].

Таким образом, цель настоящего исследования — определить для растений семейства *Brassicaceae* число копий (CNV) на геном по пяти генетическим маркерам BnGMS180, BrGMS102, BrgMS372, BrGMS4511 и SSR0110, ассоциация которых с устойчивостью к пониженным температурам и морозостойкостью была продемонстрирована в ряде научных исследований [15–17].

Материалы и методы

Биологические образцы

Материалом для исследования служили образцы семян 51 сорта культурных растений семейства *Brassicaceae* различного ареала (табл. 1).

Семена получены из коллекций: РУП «Научно-практический центр НАН Беларуси по земледелию» (Жодино, Беларусь), ФГБНУ Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н. И. Вавилова (Санкт-Петербург, Россия).

Оценка качества семян вначале проводилась органолептически: по запаху, цвету и их внешним признакам. Перед началом отсчета семян для анализа были осмотрены все образцы на наличие поврежденных, плесневелых или имеющих внешние изменения семян. Далее было подготовлено требуемое количество чашек Петри, которые тщательно вымыли, высушили и обработали изнутри смоченной в этиловом

спирте марлей. Для проращивания семян (25–30 шт. на одну чашку Петри) в качестве подстилки использовали фильтровальную обеззоленную бумагу (ООО «Реакон», Россия). Для увлажнения подстилки использовали воду комнатной температуры. Проращивание вели в термостате в темноте при $25,0 \pm 1,0$ °С, для оценки всхожести на 7–8 день подсчитывали количество проросших семян. Термостат один раз в сутки в течение всего времени проращивания вентилировали путем открывания дверцы на 3–5 мин для удаления конденсата.

Выделение ДНК

Геномную ДНК выделяли из листьев индивидуальных растений (не менее 20 шт.), объединенных в пул, с использованием набора Genomic DNA Purification Kit (K0512, Thermo Fisher Scientific, США). Количественно концентрацию ДНК определяли с использованием флюориметра Quantus Fluorometer (E6150, Promega) и QuantiFluor ONE dsDNA System

Таблица 1

Информация о биологических образцах, включенных в исследование

Вид	Сорт	Страна
Брюква <i>Brassica napus</i> var. <i>napobrassica</i> (L.) Döll	Svalof Victoria	Швеция
	Местная	Россия
Капуста полевая <i>Brassica rapa</i> ssp. <i>oleifera</i> (DC.) Metzg	Бемуар	Беларусь
	Морана	
	Зався	
	Латвийская 6	Латвия
	Злата	Россия
	Gruber	Финляндия
	Rapido	
Репа кормовая — турнепс <i>Brassica rapa</i> L. ssp. <i>rapa</i> Metzg.	Ova Daehnfeldt	Дания
	Brunstadnepe	Норвегия
Репа листовая форма комацуна <i>Brassica rapa</i> L. ssp. <i>rapa</i> var. <i>komatsuna</i> Makino	Goseki Late	Япония
	Okute Oosaka Shirona	

Окончание таблицы 1

Вид	Сорт	Страна
Рапс <i>Brassica napus</i> L.	Зенит	Беларусь
	Ветразь	
	Август	
	Мартын	
	Днепр	
	Гордон	
	Федор	
	Лидер	
	Империял	
	Арсенал	
	Прогресс	
	Добродей	
	Sutton's Favorite	Великобритания
	Hungry gar	
	Asparagus	
	Dunne	Германия
	Schnitt brauner	
	Schnitt gruner	
	Гедемин х Крис	Казахстан
	Гранит х Крис	
	M401	
	Tall Scotch curled	Канада
	Pabularia	Новая Зеландия
	Forrajero	Перу
	Лауреат	Россия
	Столичный	
	Горизонт	
	Норд	
	Северянин	
	Вик2	
	Чорний Велетень	Украина
	Синтетик	
	Кодиак	Франция
	Jet Neuf	
	Osiq sensaps	Швеция
	Каванагаре	Япония
	Васэ Абурана	
	Зорны	Беларусь

(E4870, Promega). Качественно препараты геномной ДНК анализировали с использованием электрофореза в 2,0% агарозе (ТАЕ-буфер) при 80 V в течение 90 мин. Для всех образцов было показано высокое содержание двухцепочечной (нативной) фракции ДНК, РНК при этом отсутствовала (рис. 1).

CNV

Генетические маркеры для анализа были отобраны на основании ранее проведенных исследований [18, 19]. Для оценки копийности исследуемых локусов нами были смоделированы олигонуклеотиды (табл. 2), фланкирующие небольшой фрагмент в пределах ампли-

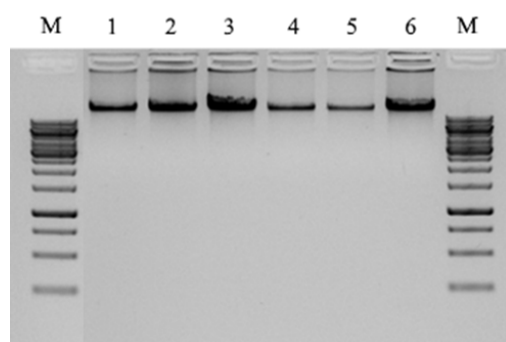


Рис. 1. Результат электрофоретической оценки нативности препаратов ДНК, лунки 1–6 — образцы №1–6 соответственно, М — маркер молекулярного веса GeneRuler 1 kb (SM0311, ThermoFisher Scientific, Литва)

Таблица 2

Последовательности олигонуклеотидов для определения CNV

Маркер	Праймеры		Размер ампликона, п. н.
BnGMS180	F R	5'-GTCTTGTTTTGGTGTGGCTT-3' 5'-GCAGAGGCTTGAGATACACCA-3'	105
BrGMS102	F R	5'-GCTCATACATTTGGAAGAGCACA-3' 5'-ACTCGGGTCTGGTTTATTGGT-3'	84
BrgMS372	F R	5'-TTCGGTTTCTACGTCGCTGT-3' 5'-TGGTGCTATTGTTGGCGAATG-3'	61
BrGMS4511	F R	5'-GTTGGTGCTCCTAAATTCCTTAGC-3' 5'-GGCCGCCATATGTCAGTGAA-3'	84
SSRO110	F R	5'-AACGGAAGAATCAACGGACCC-3' 5'-TGTGCTGGTCGAACGGTTA-3'	60

кона, синтезирующегося при использовании оригинальных праймеров [6, 21].

ПЦР

Целевые фрагменты ДНК амплифицировали с локуспецифическими парами олигонуклеотидов (праймеров), фланкирующими участки последовательностей генов, детерминирующих различия в устойчивости к пониженным температурам и устойчивости к замораживанию у семейства *Brassicaceae*. ПЦР проводили на амплификаторе QuantStudio 5 (Applied Biosystems, США) со следующими температурно-временными условиями: 5 мин — 95 °C, 40 циклов: 15 сек — 95 °C,

60 сек — 60 °C. Для ПЦР использовали мастер-микс qPCRmix-HS LowROX (PK154L, Eurogen, Россия), в качестве интеркалирующего красителя — EvaGreen (PCR-379, Jena Bioscience, Германия). Итоговая концентрация праймеров в смеси — 0,2 пмоль/мкл. Количество ДНК в реакции — 10–50 нг. Далее следовал этап плавления ампликонов (Melt Curve Stage), с помощью которого осуществляли первичную оценку специфичности ПЦР.

Для минимизации технической погрешности проведения количественной ПЦР (кПЦР) методика выполнялась в трипликатах для каждого образца с последующим усреднением.

Также для минимизации технической погрешности для каждого образца брали две аликвоты по концентрации ДНК — 1х и 0,5х, впоследствии для анализа использовали среднее значение C_t и C_p , соответствующее каждому из разведений.

Контроль эффективности ПЦР для каждого анализируемого локуса для каждого вида семейства *Brassicaceae* проводили с использованием серии разведений ДНК с построением калибровочной прямой. По графикам линейной регрессии, построенным на основании зависимости порогового значения C_t от разведений образцов ДНК, определено, что R^2 находился в диапазоне 0,991–0,999.

Электрофорез

Для итоговой оценки специфичности ПЦР ампликоны разделяли электрофорезом в 2,0%-ном агарозном геле при напряжении 100 V в течение 60 мин. В качестве интеркалирующего красителя использовали EtBr. Результаты электрофореза документировали с помощью системы E-Box CX5 (Vilber, Германия), программное обеспечение E-Box CX5 TS Edge 18.01. В результате для всех генетических маркеров было показано наличие специфического ампликона, неспецифические продукты амплификации отсутствовали.

Статистический анализ

Для анализа графиков, полученных при проведении кПЦР, нами выбраны два алгоритма: пороговый метод, основанный на определении значения порогового цикла реакции C_t (threshold cycle), который реализован в программе QuantStudio™ Design & Analysis Software для прибора QuantStudio 5 [22]; и метод прямого сравнения графиков C_p (crossing point), который реализован в про-

грамме LinRegPCR v.11.0 [23].

Определение уровня CNV производилось с помощью относительной количественной оценки [24]. Общий вид математической модели детекции CNV имеет вид: $R = 2^{-(\frac{C_{\text{образец}}}{\text{образец}} - \frac{C_{\text{контроль}}}{\text{контроль}})}$.

Матрица дистанций на основании расчетов CNV по методу многомерного шкалирования (ALSCAL, Multidimensional scaling) построена в SPSS v.20, использован алгоритм «квадрат расстояния Евклида», проведена Z-стандартизация. Графическая визуализация матрицы произведена в программе Past v.4.03 [25].

Результаты и обсуждения

Для успешной амплификации и последующего сопоставления результатов для нескольких биологических видов в рамках семейства *Brassicaceae* (брюква, капуста полевая, рапс, репа кормовая — турнепс, репа листовая форма комацуна) необходимо было добиться высокой специфичности для отжига смоделированных олигонуклеотидов. Биоинформатический анализ показал, что для смоделированных нами праймеров наличие некомплементарных оснований сведено к минимуму, а небольшой размер синтезируемых в процессе кПЦР ампликонов призван нивелировать разницу в эффективности амплификации при последующем объединении результатов для нескольких генетических маркеров, поскольку эффективность ПЦР зависит, в том числе, от размера ампликона. На основании анализа в Primer-BLAST определены потенциальные места отжига смоделированных праймеров для генома *Brassica napus*, таблица 3.

Для сравнения графиков, полученных при проведении кПЦР, нами применены два основных подхода к анализу результатов: пороговый

Таблица 3

Места отжига смоделированных праймеров для генома *Brassica napus*

Маркер	Хромосомная позиция*	RefSeq
BnGMS180	(01) Ch.A8:g.1102864-1102968	NC_027764.2
	(02) Ch.C3:g.79006606-79006710	NC_027769.2
	(03) Ch.C3:g.78998945-78999049	NC_027769.2
	(04) Ch.C3:g.45100479-45100583	NC_027769.2
	(05) Ch.A2:g.20447976-20448080	NC_027758.2
	(06) Ch.C9:g.19311036-19311140	NC_027775.2

Окончание таблицы 3

Маркер	Хромосомная позиция*	RefSeq
BrGMS102	(01) Ch.C4:g.65356485-65356568	NC_027770.2
	(02) Ch.C4:g.65352512-65352595	NC_027770.2
	(03) Ch.A4:g.19864013-19864096	NC_027760.2
	(04) Ch.A3:g.12490171-12490254	NC_027759.2
	(05) Ch.A3:g.12499096-12499179	NC_027759.2
	(06) Ch.A9:g.23176029-23176112	NC_027765.2
BrgMS372	(01) Ch.C3:g.8732776-8732836	NC_027774.2
	(02) Ch.A8:g.7549803-7549863	NC_027764.2
BrGMS4511	(01) Ch.A2:g.2700019-2700102	NC_027758.2
	(02) Ch.C2:g.620184-620267	NC_027768.2
SSRO110	(01) Ch.A8:g.15859044-15859103	NC_027764.2
	(02) Ch.C3:g.73063827-73063886	NC_027769.2

Примечание. * *Brassica napus* Bra_napus_v2.0, GCA_000686985.2 (PRJNA293435)

метод с определением точки пересечения графика накопления ДНК и пороговой линии (Ct), метод прямого сравнения графиков накопления ДНК по форме кривой (Cp).

Суть порогового метода заключается в том, чтобы определить момент Ct (выраженный в циклах ПЦР), когда количество ДНК в реакционной пробирке и, следовательно, флуоресцентный сигнал достигает одинаковой для всех образцов пороговой величины Nt (по умолчанию задается программным обеспечением к прибору). Чем меньше Ct, тем больше было в образце целевой ДНК в начальный момент времени. Для корректной работы порогового метода необходимым условием является сходство коэффициентов преобразования уровня флуоресценции в количество ДНК.

К методам прямого сравнения результатов по форме графика относятся подходы с использованием первой и второй производных графиков накопления ДНК. В большинстве случаев методы прямого сравнения результатов по форме графика дают более надежные результаты, поскольку позволяют игнорировать (не принимать во внимание) значения коэффициента преобразования уровня флуоресценции в количество ДНК. Максимум второй производной в большинстве случаев находится внутри экспоненциального участка кривой

ПЦР, т. е. зоны графика, где E (эффективность ПЦР) еще постоянна.

Для корректного анализа нами были использованы оба подхода. В результате для всех генетических маркеров коэффициент корреляции Ct и Cp стремился к 1,0. Далее для всех генетических маркеров было рассчитано значение C_{mean} по формуле $(Ct + Cp)/2$. Данный подход оказался оправдан, в особенности для тех образцов, для которых разница между Ct и Cp составляла более 20%. Частота встречаемости таких случаев не превышала 5% (рис. 2).

Результаты проведенного молекулярно-генетического анализа подтверждают, что для генетических маркеров BrgMS372 и SSRO110 имеется линейная зависимость значений C_{mean} от значения $\text{Log}_{[конц. ДНК]}$ (коэффициенты R^2 в диапазоне 0,985–1,0). Данная зависимость характерна для всех исследуемых биологических видов семейства *Brassicaceae* (рис. 3). Полученные данные согласуются с таблицей 3 и подтверждают, что для генетических маркеров BrgMS372 и SSRO110 имеется равное количество копий на геном.

Далее был проведен расчет параметра ΔC для генетических маркеров BnGMS180, BrGMS102 и BrGMS4511 относительно генетических маркеров BrgMS372 и SSRO110, и по формуле $2^{-\Delta C}$ рассчитано значение CNV. Результаты по оцен-

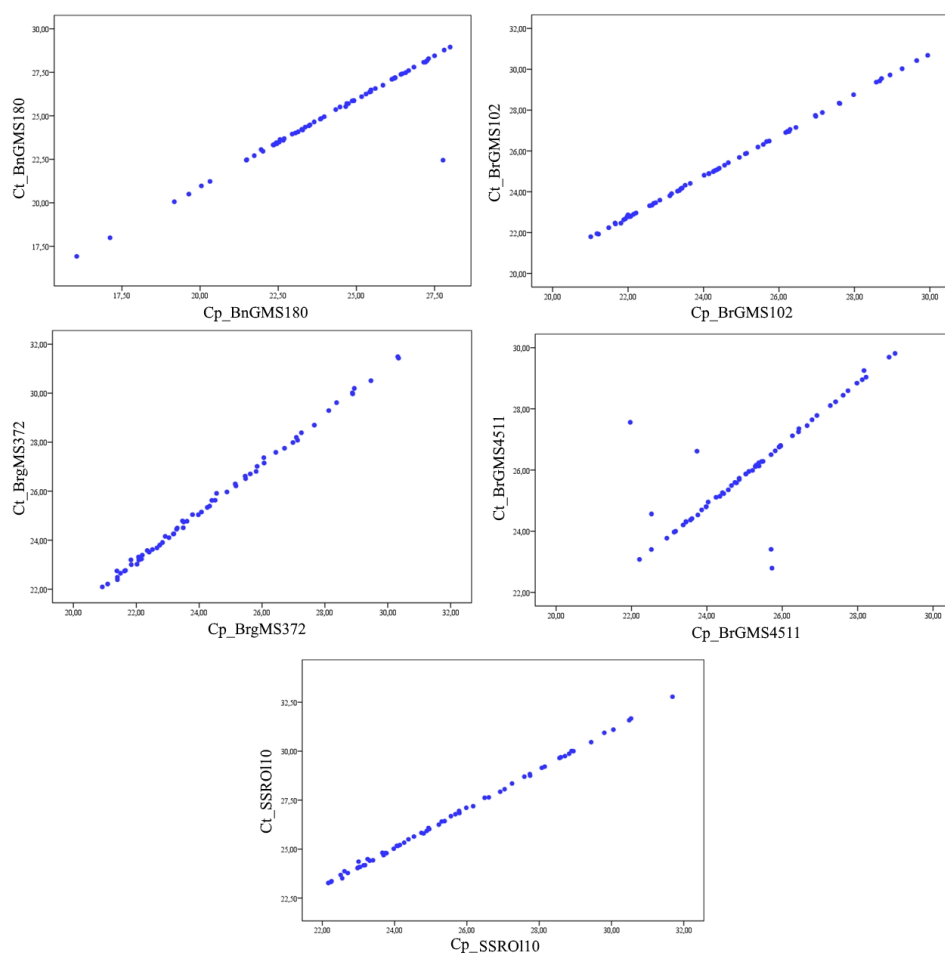


Рис. 2. Сравнение Ct и Cp для исследуемых генетических маркеров

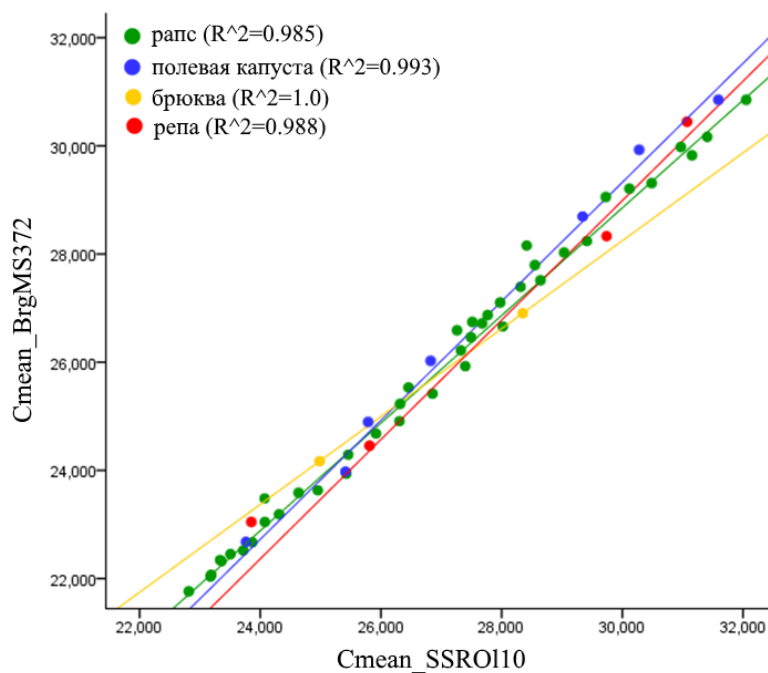


Рис. 3. Зависимость между значениями C_{mean} для генетических маркеров BrgMS372 и SSRO110

ке CNV округлены до двух знаков после запятой и представлены в таблице 4.

Значения в таблице 4 в диапазоне $\leq 1,2$ указывает на две копии участка ДНК, а более 1,4 рассматривается как увеличение копийности.

Наибольший полиморфизм значений CNV показан для генетического маркера BnGMS180, диапазон значений варьировал от 0,48 (сорт рапса Мартын, Беларусь) до 12,61 (сорт брюквы Sutton's Favorite, Швеция). Для генетических маркеров BrGMS102 и BrGMS4511 показан незначительный полиморфизм в диапазоне 0,34–1,55 и 0,55–1,05 соответственно.

Значения CNV $> 1,4$ для генетического маркера BnGMS180 были характерны для всех исследуемых видов в семействе *Brassicaceae*, а именно:

- *Brassica napus* L. — Зенит (Беларусь), Forrajero (Перу), Чорний Велетень (Украина), Schnitt gruner (Германия), Jet Neuf (Франция), Asparagus и Sutton's Favorite (Великобритания), M401 (Казахстан) и Лауреат (Россия);

- *Brassica napus* var. *napobrassica* (L.) Döll — Местная (Россия);

- *Brassica rapa* ssp. *oleifera* (DC.) Metzg — Gruber и Rapido (Финляндия), Латвийская 6 (Латвия);

- *Brassica rapa* L. ssp. *rapa* var. *komatsuna* Makino — Okute Oosaka Shirona (Япония);

- *Brassica rapa* L. ssp. *rapa* Metzg — Ova Daehnfeldt (Дания) и Brunstadnepe (Норвегия).

Значения CNV $> 1,4$ для генетического маркера BrGMS102 установлены только для сорта *Brassica rapa* ssp. *oleifera* (DC.) Metzg — Rapido (Финляндия).

На основании полученных данных по CNV с использованием метода многомерного шкалирования (ALSCAL) в SPSS v.20 построена матрица дистанций, с использованием которой по методу ближайших соседей (Neighbor joining) в PAST v.4.03 построено дерево кластеризации (рис. 4).

В пределах дерева кластеризации представляется возможным выделить три кластера (рис. 4). В целом, подразделенность на кластеры обусловлена вкладом включенных в анализ переменных (в данном случае значения CNV для генетических маркеров), наибольший вклад из которых приходится на BnGMS180. Тот факт, что данный генетический маркер и его эволюционно сформированные изоформы, которые распределены по геному растений семейства *Brassicaceae*, распространен в широком ареале, охватывающем несколько континентов с порой весьма контрастными климатическими условиями, косвенно свидетельствует о его ассоциации с реакцией растения на холодостресс. Однако следует учитывать, что анализ CNV не позволяет дать ответ на вопрос, являются ли выявленные аллели функционально значимыми. Выяснить это предстоит в последующих исследованиях, направленных на анализ экспрессии ряда транскрипционных факторов.

Ранее было показано, что SSR-маркер BnGMS180, ассоциированный с QTL холодостойкости у рапса, позволяет выявить у *B. napus* фрагменты размером 383 п. н. (устойчивые формы) и 361 п. н. (чувствительные формы) [16, 17]. Установлено, что япон-

Таблица 4
Значения CNV для генетических маркеров BnGMS180, BrGMS102 и BrGMS4511

Вид	Сорт	BnGMS180	BrGMS102	BrGMS4511
Брюква <i>Brassica napus</i> var. <i>napobrassica</i> (L.) Döll	Svalof Victoria	1,06	0,63	0,85
	Местная	1,46	0,93	0,84
Капуста полевая <i>Brassica rapa</i> ssp. <i>oleifera</i> (DC.) Metzg	Gruber	1,76	1,00	0,69
	Rapido	7,53	1,55	0,55
	Бемуар	0,58	0,84	0,92
	Завея	0,89	0,75	0,85
	Злата	0,66	0,66	1,05
	Латвийская 6	1,94	0,93	0,89
	Морана	0,70	0,63	0,79

Окончание таблицы 4

Вид	Сорт	BnGMS180	BrGMS102	BrGMS4511
Рапс <i>Brassica napus</i> L.	Asparagus	6,10	1,31	0,91
	Dunne	1,26	0,49	0,86
	Forrajero	1,84	0,59	0,67
	Hungry gar	0,94	0,59	0,89
	Jet Neuf	3,25	0,63	0,84
	Osiq sensaps	0,60	0,54	0,67
	Pabularia	1,01	0,86	0,94
	Schnitt brauner	0,88	0,95	0,88
	Schnitt gruner	2,09	0,79	0,93
	Sutton's Favorite	12,61	0,67	0,90
	Tall Scotch curled	1,18	0,90	1,04
	Август	1,05	0,70	0,82
	Арсенал	0,67	0,63	0,88
	Васэ Абурана	1,03	0,82	0,87
	Ветразь	0,94	0,70	0,87
	Вик2	1,16	0,98	0,92
	Гедемин х Крис	1,02	0,62	0,90
	Гордон	1,32	1,22	0,88
	Горизонт	1,15	0,80	0,84
	Гранит х Крис	1,03	0,76	0,84
	Днепр	0,56	0,48	0,81
	Добродей	1,21	0,71	0,89
	Зенит	1,57	0,58	0,85
	Зорны	0,67	0,67	0,82
	Империял	1,16	0,89	0,88
	Каванагаре	1,17	0,99	0,91
	Кодиак	0,74	0,42	0,86
	Лауреат	6,82	0,66	0,83
	Лидер	0,67	0,66	0,90
	M401	6,11	0,57	0,85
	Мартын	0,48	0,46	0,67
	Норд	1,06	0,65	0,85
	Прогресс	0,63	0,54	0,92
	Северянин	1,25	0,68	0,84
	Синтетик	0,89	0,76	0,84
	Столичный	1,15	0,73	0,81
	Федор	0,58	0,85	0,93
	Чорний Велетень	2,08	0,72	0,86
Репа кормовая — турнепс <i>Brassica rapa</i> L. ssp. <i>rapa</i> Metzg.	Brunstadnepe	9,64	0,72	0,90
	Ova Daehnfeldt	2,16	0,51	0,88
Репа листовая форма комацуна <i>Brassica rapa</i> L. ssp. <i>rapa</i> var. <i>komatsuna</i> Makino	Okute Oosaka Shirona	4,17	0,59	0,87
	Goseki Late	1,00	0,34	0,90

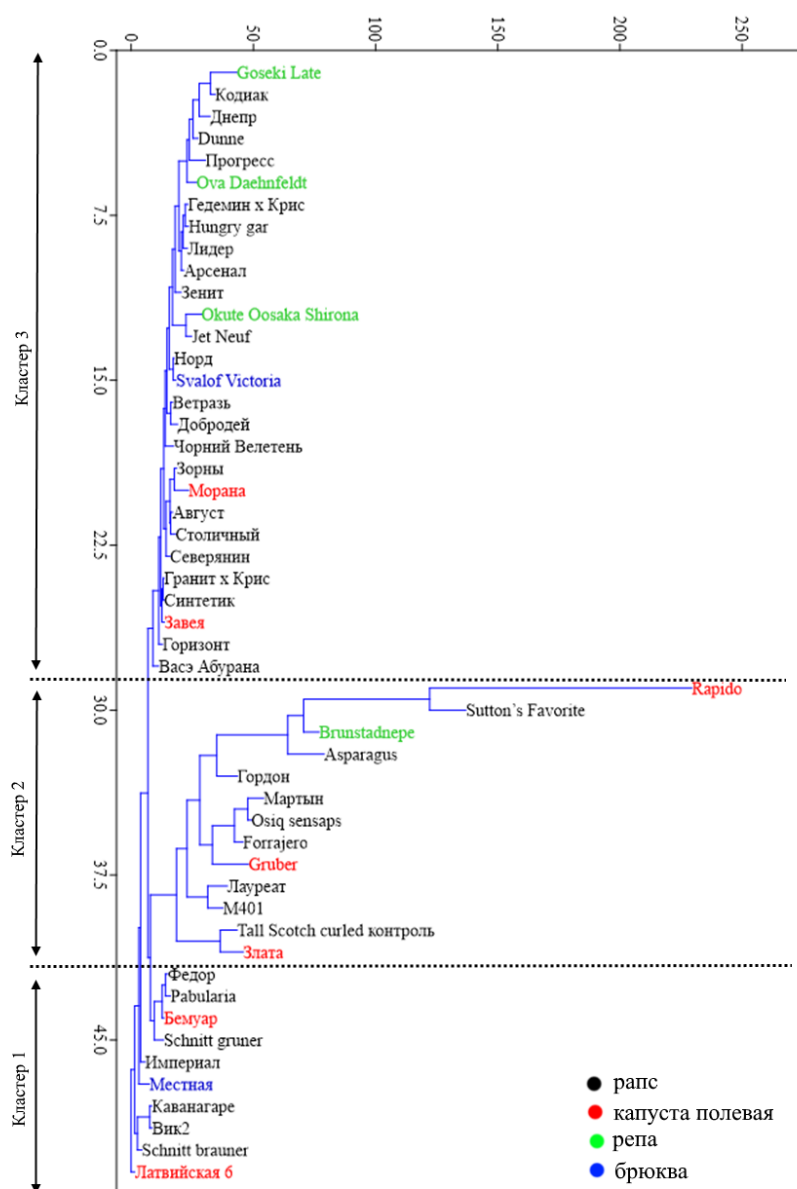


Рис. 4. Дерево кластеризации для исследуемых образцов на основании значений CNV для генетических маркеров BnGMS180, BrGMS102 и BrGMS4511

ский сорт рапса Васэ Абурана содержал уникальный фрагмент размером 400 п. н. наряду с фрагментом 361 п. н. [19]. В то же время увеличений копийности по данному локусу для сорта рапса Васэ Абурана не выявлено.

Среди сортов рапса, для которых по BnGMS180 установлено увеличение параметра CNV, а именно: Schnitt gruner (Германия), Sutton's Favourite (Великобритания), Лауреат (Россия) и Чорний велетень (Украина) показано наличие чувствительных форм, ассоциированных со слабым эффектом на холодовой стресс (361 п. н.), в то время как для остальных

образцов из этой группы выявлено наличие устойчивых форм, ассоциированных с выраженным эффектом на холодовой стресс (383 п. н.) [19].

В целом, результаты научных исследований, направленных на оценку вклада генетического локуса BnGMS180 в ответную реакцию растений на холодовой стресс, свидетельствуют о том, что с этим локусом ассоциированы множественные эффекты, вызывающие заметные изменения в метаболизме и транскриптоме рапса в ответ на колебания температуры окружающей среды [26].

Заключение

На основании результатов проведенных исследований по определению числа копий на геном (CNV) по пяти генетическим маркерам для 51 сорта растений семейства *Brassicaceae* различного ареала сделаны следующие выводы:

- наибольшая вариация относительных значений CNV показана для генетического маркера BnGMS180, диапазон значений варьировал от 0,48 (сорт рапса Мартын, Беларусь) до 12,61 (сорт брюквы Sutton's Favorite, Швеция). Значения CNV >1,4 были характерны для всех исследуемых видов (рапс, полевая капуста, репа, брюква) в рамках семейства *Brassicaceae*, культивируемых по всему миру (Беларусь, Перу, Украина, Германия, Франция, Казахстан, Россия, Финляндия, Япония, Норвегия и др.);
- значения CNV >1,4 для генетического маркера BrGMS102 были показаны только для сорта *Brassica rapa ssp. oleifera* (DC.) Metzg — Rapido (Финляндия);
- увеличение CNV больше двух на геном для генетических маркеров BrgMS372, BrgMS4511 и SSR0110 не выявлено.

Исследование выполнено в рамках ГПНИ «Биотехнологии-2», подпрограмма «Геномика, эпигеномика, биоинформатика» 2021-2023 годы, тема НИР «Изучение экспрессии генов А- и С-геномов семейства Brassicaceae, ассоциированных с морозостойкостью».

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список использованных источников

1. Örvär, B. L. Early steps in cold sensing by plant cells: the role of actin cytoskeleton and membrane fluidity / B. L. Örvär [et al.] // The Plant Journal. – 2000. – Vol. 23(6). – P. 785–794. DOI: 10.1046/j.1365-3113x.2000.00845.x.
2. Chinnusamy, V. Cold stress regulation of gene expression in plants / V. Chinnusamy [et al.] // Trends in Plant Sci. – 2007. – Vol. 12(10). – P. 444–451. DOI: 10.1016/j.tplants.2007.07.002
3. Prospects for transgenic and molecular breeding for cold tolerance in canola (*Brassica napus* L.). / Oilseeds, ed.: Uduak G. Akpan. – Croatia: InTech. – 2012. – 184 p.
4. Bais, H. P. Allelopathy and exotic plant invasion: from molecules and genes to species interactions / H. P. Bais [et al.] // Science. – 2003. – Vol. 301. – P. 1 377–1 380. DOI: 10.1126/science.1083245.
5. Monroy, A. F. Regulatory gene candidates and gene expression analysis of cold acclimation in winter and spring wheat / A. F. Monroy [et al.] // Plant Mol Biol. – 2007. – Vol. 64, № 4. – P. 409–423. DOI: 10.1007/s11103-007-9161-z
6. Huang, Z. Analysis of cold resistance and identification of SSR markers linked to cold resistance genes in *Brassica rapa* L. / Z. Huang [et al.] // Breed Sci. – 2017. – Vol. 67(3). – P. 213–220. DOI: 10.1270/jsbbs.16161.
7. Song, H. Allelic variation in *Brassica oleracea* CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1 (BoCCA1) is associated with freezing tolerance / H. Song [et al.] // Hortic. Environ. Biotechnol. – 2018. – Vol. 59, № 3 – P. 423–434. DOI: 10.1007/s13580-018-0045-8.
8. Maibam, P. The Influence of Light Quality, Circadian Rhythm, and Photoperiod on the CBF-Mediated Freezing Tolerance / P. Maibam [et al.] // Int. J. Mol. Sci. – 2013. – Vol. 14. – P. 11 527–11 543. DOI: 10.3390/ijms140611527.
9. Ahmed, N. U. Anthocyanin biosynthesis for cold and freezing stress tolerance and desirable color in *Brassica rapa* / N. U. Ahmed [et al.] // Functional & Integrative Genomics. – 2014. – Vol. 15, № 4. – P. 383–394. DOI: 10.1007/s10142-014-0427-7.
10. Mareri, L. Influence of CNV on transcript levels of HvCBF genes at Fr-H2 locus revealed by resequencing in resistant barley cv. 'Nure' and expression analysis / L. Mareri [et al.] // Plant Sci. – 2020. – e.290:110305. DOI: 10.1016/j.plantsci.2019.110305.
11. Francia, E. Copy number variation at the HvCBF4-HvCBF2 genomic segment is a major component of frost resistance in barley / E. Francia [et al.] // Plant Mol. Biol. – 2016. – Vol. 92(1–2). – P. 161–175. DOI: 10.1007/s11103-016-0505-4.
12. Knox, A. K. CBF gene copy number variation at Frost Resistance-2 is associated with levels of freezing tolerance in temperate-climate cereals / A. K. Knox [et al.] // Theor. Appl. Genet. – 2010. – Vol. 121(1). – P. 21–35. DOI: 10.1007/s00122-010-1288-7.
13. Sandve, S. R. Molecular mechanisms underlying frost tolerance in perennial grasses adapted to cold climates / S. R. Sandve [et al.] //

- Plant Sci. – 2011. – Vol. 180(1). – P. 69–77. DOI: 10.1016/j.plantsci.2010.07.011.
14. Tondelli, A. Inside the CBF locus in Poaceae / A. Tondelli [et al.] // Plant Sci. – 2011. – Vol. 180(1). – P. 39–45. DOI: 10.1016/j.plantsci.2010.08.012.
15. Mapping of quantitative trait loci related to cold resistance in *Brassica napus* L. / Z. Huang [et al.] // J. Plant Physiol. – 2018. – Vol. 231. – P. 147–154. DOI: 10.1016/j.jplph.2018.09.012.
16. Analysis of cold resistance and identification of SSR markers linked to cold resistance genes in *Brassica rapa* L. / Z. Huang [et al.] // Breeding Science. – 2017. – Vol. 67. – P. 213–220. DOI:10.1270/jsbbs.16161.
17. Genetic variability between several *Brassicaceae* populations of different winter survival ability / B. Rakić [et al.] // In: 12th IRC: Sustainable Development in Cruciferous Oilseed Crops Production. Vol. 2. – Wuhan, China. – 2007. – P. 78–80.
18. Амосова, А. В. Геномные маркеры, ассоциированные с устойчивостью к низким температурам у *Brassica rapa* L. / А. В. Амосова [и др.] // Молекулярная биология. – 2020. – Т. 54(4). – С. 603–615. DOI:10.31857/S0026898420040035.
19. Лемеш, В. А. Полиморфизм аллелей, ассоциированных с устойчивостью к низким температурам, у представителей семейства *Brassicaceae* с широким ареалом распространения / В. А. Лемеш, Г. В. Мозгова, В. Н. Кипень, Л. В. Хотылёва // Молекулярная и прикладная генетика. – 2022. – Т. 32. – С. 18–27. DOI: 10.47612/1999-9127-2022-32-18-27.
20. Cai, G. A complex recombination pattern in the genome of allotetraploid *Brassica napus* as revealed by a high-density genetic map / G. Cai [et al.] // PLoS One. – 2014 – Vol. 9(10). – e109910. DOI: 10.1371/journal.pone.0109910.
21. Kole, C. Linkage mapping of genes controlling resistance to white rust (*Albugo candida*) in *Brassica rapa* (syn. *campestris*) and comparative mapping to *Brassica napus* and *Arabidopsis thaliana* / C. Kole, P. H. Williams, S. R. Rimmer, T. C. Osborn // Genome. – 2002. – Vol. 45(1). – P. 22–27. DOI: 10.1139/g01-123.
22. QuantStudio™ Design and Analysis Software USER GUIDE [Электронный ресурс]. – Режим доступа: https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/MAN0010408_QuantStudioDesign_Analysis_Desktop_Software_UG.pdf – Дата доступа: 25.08.2022.
23. LinRegPCR (11.0) Analysis of quantitative RT-PCR data [Электронный ресурс]. – Режим доступа: https://www.gene-quantification.de/LinRegPCR_help_manual_v11.0.pdf – Дата доступа: 25.08.2022.
24. Pfaffl, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time PCR / M. W. Pfaffl // Nucleic Acids Res. – 2001. – Vol. 29(9). – P. 16–21. DOI: 10.1093/nar/29.9.e45.
25. Hammer, Q. Past: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis / Q. Hammer, A. T. Harper, P. D. Ryan // Palaeontologia Electronica. – 2001. – Vol. 4(1). – P. 1–9.
26. Jian, H. Characterization of cold stress responses in different rapeseed ecotypes based on metabolomics and transcriptomics analyses / H. Jian [et al.] // PeerJ. – 2020. – Vol. 8. – e8704. DOI: 10.7717/peerj.8704.

V. A. Lemesh, V. N. Kipen, G. V. Mozgova, L. V. Khotyleva

VARIATION IN THE COPY NUMBER OF DNA REGIONS FOR THE *BRASSICACEAE* FAMILY ASSOCIATED WITH COLD RESISTANCE

State Scientific Institution

"Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus"

27 Akademicheskaya St., 220072 Minsk, Republic of Belarus

e-mail: V.Lemesh@igc.by

We determined copy number variation (CNV) per genome by five genetic markers BnGMS180, BrGMS102, BrGMS372, BrGMS4511 and SSRO110 associated with low temperatures and frost resistance for 51 cultivated plants of the *Brassicaceae* family with a wide cultivation range. It was shown that the genetic marker BnGMS180 has the greatest range of variations in the CNV value. The range of values varied from 0.48 (rapeseed variety Martyn, Belarus) to 12.61 (rutabaga variety Sutton's Favorite, Sweden). For other genetic markers, variation in CNV values is insignificant.

Keywords: CNV, Copy Number Variation, *Brassicaceae*, genetic markers, cold resistance.

Дата поступления в редакцию: 30 августа 2022 г.

Т. А. Гапеева

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ЭФФЕКТИВНОСТИ МЕТОДИК РЕГЕНЕРАЦИИ ИЗ ЭКСПЛАНТОВ РАСТЕНИЙ РАПСА СОРТОВ МАГНАТ И ЛИДЕР

Государственное научное учреждение

«Институт биофизики и клеточной инженерии Национальной академии наук Беларуси»

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

e-mail: tamaralex@mail.ru

Проведен сравнительный анализ эффективности органогенеза из каллусных клеток эксплантов гипокотилей районированных в Беларуси сортов рапса Лидер и Магнат. Установлено, что сорт Лидер является более пригодным для органогенеза из эксплантов растений *in vitro*, чем сорт Магнат. Показано, что для сорта Лидер при использовании методического приема, в соответствии с которым экспланты гипокотилей подвергаются воздействию сначала ауксина (2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота, 1 мг/л), а затем цитокинина (6-бензиламинопурин, 5-8 мг/л), эффективность регенерации составляет до 10 адаптированных *ex vitro* растений с одного экспланта.

Ключевые слова: рапс, культура тканей растений, экспланты гипокотилей, морфогенез *in vitro*, каллус.

Введение

Рапс (*Brassica napus*) является важной сельскохозяйственной культурой, основная ценность которой связана с производством рапсового масла, уступающего по масштабам использования только подсолнечному и пальмовому. Несмотря на высокую продуктивность и стабильную урожайность, существуют проблемы защиты рапса от фитопатогенных микроорганизмов, а также придания устойчивости к неблагоприятным факторам окружающей среды, например, к температурным, вызывающим гибель посевов озимого рапса в условиях Беларуси. Создание генно-модифицированных сортов рапса считается перспективным способом решения этих проблем, даже с учетом таких факторов, как возможность перекрестного опыления, а также неравномерность созревания семян, приводящая к засорению площадей для выращивания [1]. С другой стороны, высокопродуктивные семенные культуры, к которым относится и рапс, являются предпочтительными при создании растений-биофабрик для производства ценных биологически-активных веществ [2]. Следует отметить, что развитие технологий сайт-направленной модификации растительных геномов открывают возможности создания безопасных сортов растений с примени-

ем генно-инженерных приемов [3].

Для получения трансгенных растений широко используются методы агробактериальной трансформации, прежде всего способ инокуляции эксплантов агробактериями с последующим созданием условий для проявления тотипотентности растительных клеток, приводящей к генерации целого организма из клетки на селективной среде. Однако рапс относится к видам растений, для которых эффективность данного метода существенно зависит от генотипа [4]. Существуют сорта рапса практически не поддающиеся трансформации путем инокуляции эксплантов. Это обстоятельство стимулировало разработку приемов для агробактериальной трансформации растений рапса *in planta* или *in vivo* ("floral-dip", трансформация семян и др.), но опубликованные данные по успешному применению данных методов для получения трансгенных растений рапса на настоящий момент немногочисленны [5].

Следует отметить, что условия для регенерации из эксплантов подбираются в основном эмпирически, однако недавно появилось много исследований, раскрывающих на транскрипционном и метаболическом уровне молекулярные механизмы перепрограммирования растительных клеток и преобразования стволовых клеток [6, 7], что может способствовать

более успешной разработке условий для проявления тотипотентности клеток. Как известно, у растений органогенез как в природе, так и *in vitro* опосредован преобразованием трех различных типов стволовых клеток: апикальных стволовых клеток побега, апикальных стволовых клеток корня и сосудистых стволовых клеток [8]. В культуре тканей *in vitro* процесс развития клеток определяется двумя фитогормонами — ауксином и цитокинином. Выявлены транскрипционные факторы, индуцируемые поранением растительных тканей, участвующие в цитокиновой сигнализации и способствующие образованию каллусов [9, 10]. Образование из эксплантов органов растений каллусов, представляющих собой неорганизованную плюрипотентную массу, определяется широким диапазоном соотношений ауксин/цитокинин [11]. Как правило, создание низкого соотношения ауксин/цитокинин имеет тенденцию индуцировать у каллусов регенерацию побегов, в то время как высокое соотношение ауксина/цитокинина способствует регенерации корней [12]. Кроме того, высокая концентрация ауксина может способствовать соматическому эмбриогенезу [13, 14].

При разработке методики агробактериальной трансформации конкретного сорта рапса путем инокуляции эксплантов необходимо, прежде всего, решить задачу по подбору условий для эффективного органогенеза из каллусных клеток, так как, например, вариабельность эффективности регенерации побегов может составлять от 0% до 91% [4]. Целью данной работы был сравнительный анализ эффективности методик органогенеза из эксплантов растений районированных в Беларуси сортов рапса Лидер и Магнат для последующего использования при агробактериальной трансформации.

Материалы и методы

Семена рапса сортов Магнат и Лидер были предоставлены РУП «НПЦ НАН Беларуси по земледелию».

Семена рапса поверхностно стерилизовали в 70% этаноле (10 мин), а затем в 10% перекиси водорода (10 мин), после чего несколько раз промывали стерильной водой, подсушивали в стерильных условиях и высевали на агаризованные среды.

Растения *in vitro* культивировали при температуре 25 °C с 16/8-часовым фотопериодом (200 мкм м⁻² с⁻¹; лампы LF 35W/54-765, Philips, Польша).

Экспланты гипокотилей (размером около 1 см) и листовых пластинок получали из растений 4–10-дневного возраста *in vitro* и помещали на чашки Петри с агаризованными средами (до 20 эксплантов на чашку) и культивировали с 16/8-часовым фотопериодом (50 мкм м⁻² с⁻¹; лампы LF 35W/54-765, Philips, Польша).

В качестве основы для агаризованных сред использовали среду Мурасиге и Скуга с витаминами [15], содержащую также 0,8% агар, 3% сахарозу.

Результаты и обсуждение

Известно, что эффективность регенерации побегов из эксплантов растительной ткани *in vitro* зависит от многих факторов, таких как сорт культурного растения, тип и возраст растительной ткани, используемой для получения эксплантов, условий выращивания растений, гормонального состава сред для регенерации [16]. По литературным данным, наиболее предпочтительными объектами для агробактериальной трансформации рапса *in vitro* являются экспланты гипокотилей 4–8-дневного возраста [17]. Очень важным фактором является также добавление в среды, используемые для регенерации *in vitro*, ингибиторов физиологической активности этилена, преимущественно нитрата серебра [17–19]. Хотя механизм влияния этилена на регенерационный потенциал до конца неясен, показано, что исключение нитрата серебра из сред радикально уменьшает частоту регенерации для ряда видов растений рода *Brassica*. В данной работе использовали нитрат серебра в концентрации 5 мг/л, которая, как установлено, является оптимальной для регенерации из эксплантов рапса [16].

Как уже отмечалось, эффективность той или иной методики агробактериальной трансформации рапса, включающей стадию регенерации из дедифференцированной ткани *in vitro*, сильно зависит от генотипа и отличается невысокой эффективностью, вплоть до полной устойчивости клеток эксплантов к трансформации. Протоколы, разработанные для ярового рапса лабораторного сорта Вестар, оказались

непригодными для хозяйственно ценных сортов, используемых в различных странах мира. В связи с вышесказанным для рапса актуальны как проблема разработки методик агробактериальной трансформации растений различных сортов, так и поиск универсальных приемов стимуляции органогенеза в каллусной массе *in vitro*.

Показано, что стимуляция каллусообразования ауксином с последующим исключением ауксина из среды и добавлением цитокинина в большой концентрации приводит к регенерации побегов из клеток каллусов [12]. Подобный прием, показавший свою эффективность в применении не только к сорту Вестар, но и к различным сортам рапса, районированным в Канаде [16] и Египте [20], был использован в данной работе.

Объектами для регенерации исходно были как гипокотили, так и листовые пластинки растений 4–10-дневного возраста сортов рапса Магнат (яровой сорт) и Лидер (озимый сорт). Однако уже на начальном этапе сравнения эффективности регенерации был сделан выбор в пользу гипокотилей, что согласуется с литературными данными. В соответствии с результатами, полученными в работе Mashewary

et al. [16], для регенерации каллусов из клеток эксплантов использовали ауксин 2,4-Д (2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота) в концентрации 1 мг/л. Для сорта Лидер эффективность образования и пролиферации каллусов приближалась к 100%, в то время как каллусы, образующиеся из клеток эксплантов сорта Магнат, практически не развивались, а сами экспланты постепенно подвергались некрозу. Период пролиферации каллусов составлял 15 дней, после чего каллусные образования отделялись от эксплантов и переносились на среду для образования побегов, содержащую цитокинин БАП (6-бензиламинопурин) в концентрации 5 и 8 мг/л. С целью подбора концентрации антибиотиков, используемых для агробактериальной трансформации, в среду добавляли также карбенициллин, используемый для ингибирования роста агробактерий, и канамицин — селективный антибиотик для отбора трансформированных растений. Оказалось, что добавление в среды карбенициллина (300 мг/л) существенно увеличивает скорость регенерации каллусов из клеток эксплантов рапса сорта Лидер (рис. 1). Причины такой стимуляции остаются невыясненными.

При подборе концентрации канамицина,

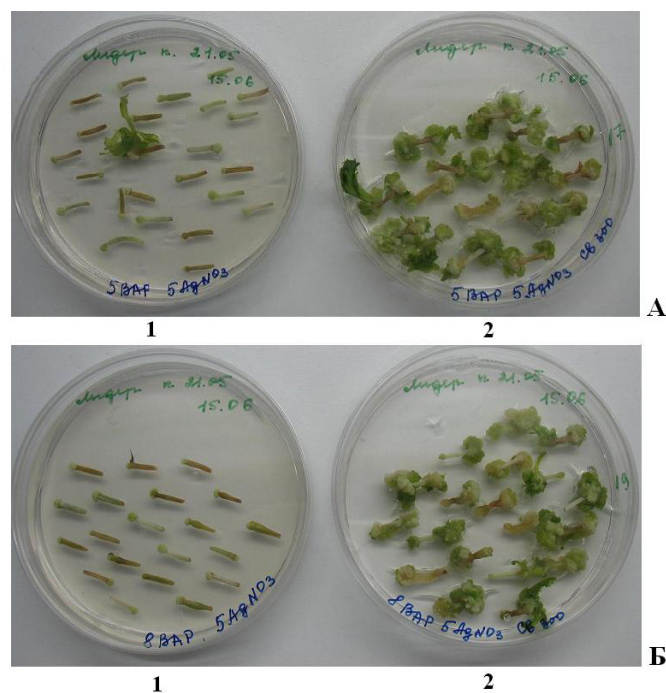


Рис. 1. Регенерация побегов из эксплантов гипокотилей рапса сорта Лидер на средах с содержанием 5 мг/л AgNO_3 и 5 мг/л БАП (А), 8 мг/л БАП (Б)
1 — без карбенициллина, 2 — с карбенициллином (300 мг/л)

наиболее часто используемого для селекции трансформированных растений, было установлено, что в концентрации 25 мг/л антибиотик полностью подавляет регенерацию зеленых побегов, а для концентрации 5 мг/л еще возможно образование зеленых регенерированных побегов (рис. 2). Известно, однако, что вследствие высокой чувствительности экс-

плантов рапса к канамицину, использование данного антибиотика в качестве селективного агента критически уменьшает эффективность трансформации [16]. С учетом этого обстоятельства целесообразно использовать канамицин в концентрации менее 25 мг/л с последующим дополнительным отбором трансформированных растений методом ПЦР.

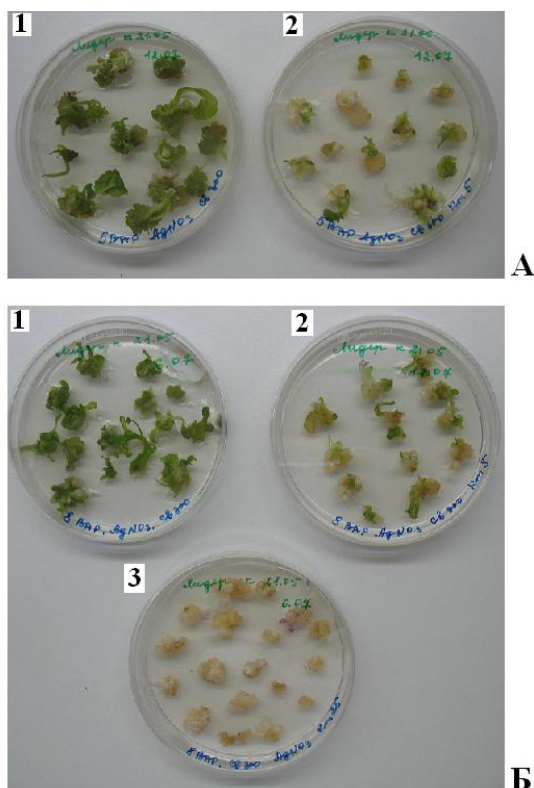


Рис. 2. Регенерация из эксплантов гипокотилей рапса сорта Лидер

А — Регенерация из каллусов на средах с содержанием 5 мг/л БАП: 1 — без канамицина, 2 — с канамицином (5 мг/л). Б — Регенерация из каллусов на средах с содержанием 8 мг/л БАП: 1 — без канамицина, 2 — с канамицином (5 мг/л), 3 — с канамицином (25 мг/л)

Каллусные образования с побегами переносили на среду для элонгации побегов с уменьшенным содержанием БАП (0,05 мг/л), а затем, примерно через 2 недели регенерированные побеги размером 2–3 см переносили на среду для укоренения, содержащую 0,1 мг/л НУК. Растения с корнями и 5–6 парами листьев переносили в почвогрунт. Было установлено, что регенерированные укоренившиеся *in vitro* растения были способны также к укоренению и росту *ex vitro* (рис. 3).

В результате 3-х независимых экспериментов по регенерации было показано, что примерно за 2 месяца с одного экспланта гипо-

котилия растения рапса сорта Лидер можно получить до 10 регенерированных растений, при этом не наблюдалось существенной разницы в эффективности регенерации для 2-х концентраций цитокинина (ВАР) — 5 и 8 мг/л. Для сорта Магнат эффективность регенерации составляла не более 1 побега на 10 эксплантов, при этом регенерированные побеги были сильно обводнены и не способны к укоренению. Таким образом, использование вышеописанного приема по разделному использованию 2-х гормонов, а именно, ауксина (1 мг/л 2,4-Д) для регенерации каллусов и цитокинина (5–8 мг/л БАП) для регенерации побегов из

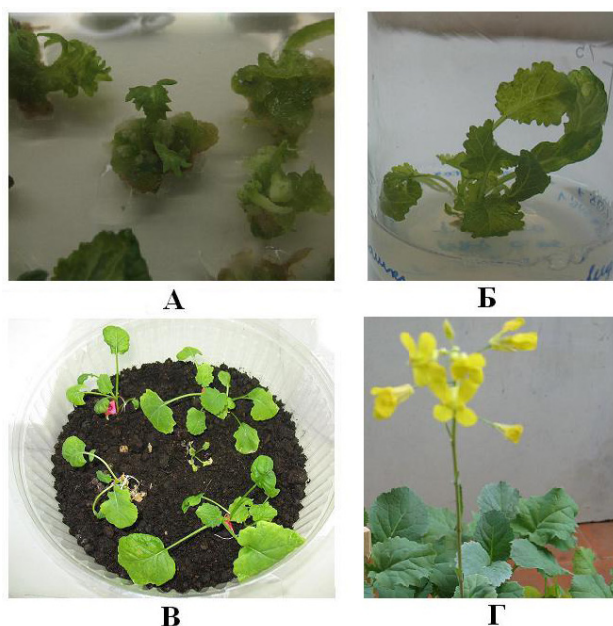


Рис. 3. Регенерация растений из эксплантов рапса сорта Лидер

А — Внешний вид каллусов с образовавшимися побегами; Б — Внешний вид регенерированных побегов на средах для укоренения; В, Г — Адаптация *ex vitro* регенерированных растений

клеток каллусов, оказалось достаточно эффективным для получения регенерированных, способных к укоренению побегов озимого сорта Лидер. Для ярового сорта Магнат регенерированных укоренившихся растений получено не было.

С целью дальнейшей оценки способности рапса сорта Магнат к регенерации растений через стадию культуры клеток были апробированы среды, которые содержат одновременно как цитокинины — БАП, зеатин, кинетин в различных сочетаниях, так и ауксин (НУК), в отличие от вышеописанной методики по раздельному применению ауксина и цитокинина. Были ис-

пользованы следующие сочетания гормонов: 1) 2 мг/л БАП и 0,2 мг/л НУК для инициации побегообразования с последующим уменьшением содержания НУК до 0,1 мг/л в среде для элонгации побегов [21]; 2) 4 мг/л БАП, 2 мг/л кинетин, 0,1 мг/л НУК для инициации и элонгации побегов; 3) 4 мг/л БАП, 2 мг/л зеатина с последующим уменьшением через 2 недели содержания БАП до 3 мг/л и переносом появляющихся побегов на среду с БАП в концентрации 0,05 мг/л [17]. Образование побегов из зеленой каллусной ткани наблюдалось для всех используемых вариантов, при этом в большей степени для последнего (рис. 4). Однако побеги

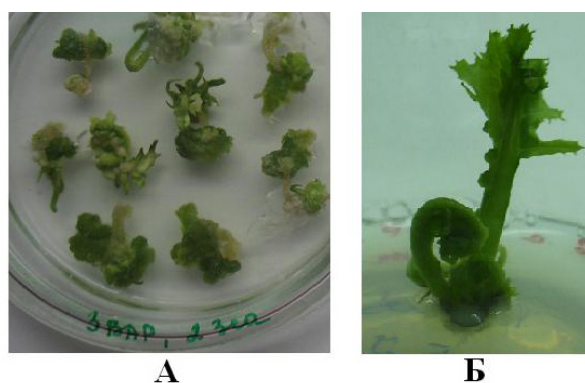


Рис. 4. Регенерация побегов из клеток каллусов для растений рапса сорта Магнат

А — картина регенерационного морфогенеза для эксплантов гипокотилей; Б — обводненный регенерированный побег

были сильно витрифицированы и в результате ни для одного варианта не было получено жизнеспособных укоренившихся в почве растений.

Заключение

В результате сравнительного анализа эффективности методик регенерации из эксплантов гипокотилей для районированных в Беларуси сортов рапса — ярового сорта Магнат и озимого сорта Лидер установлено, что сорт Лидер является более пригодным для органогенеза из эксплантов *in vitro*, чем сорт Магнат. Методический прием, в соответствии с которым экспланты гипокотилей подвергаются воздействию сначала ауксина (1 мг/л 2,4-Д) с целью регенерации каллусов из клеток эксплантов, а затем цитокинина (5–8 мг/л БАП) для регенерации побегов из клеток каллусов, показал свою эффективность по отношению к сорту Лидер и может быть использован в дальнейших экспериментах по агробактериальной трансформации.

Список использованных источников

1. Unexpected diversity of feral genetically modified oilseed rape (*Brassica napus* L.) despite a cultivation and import ban in Switzerland / J. Schulze [et al.] // PLoS One. – 2014. – Vol. 9, № 12. – e114477.
2. Singh, A. A. Approaches in plant molecular farming for global health. / A. A. Singh, P. Pillay, T. L. Tsekoo // Vaccines (Basel). – 2021. – Vol. 9, № 11. – 1 270.
3. Buyel, J. F. Targeted genome editing of plants and plant cells for biomanufacturing / J. F. Buyel, E. Stöger, L. Bortesi // Transgenic Res. – 2021. – Vol. 30, № 4. – P. 401–426.
4. Ono, Y. Effect of genotype on shoot regeneration from cotyledonary explants of rapeseed (*Brassica napus* L.) / Ono Y., [et al.] // Plant Cell Rep. – 1994. – Vol. 14. – P. 13–17.
5. Peng, D. Increasing branch and seed yield through heterologous expression of the novel rice S-acyl transferase gene OsPAT15 in *Brassica napus* L. / Peng, D. [et al.] // Breed Sci. – 2018. – Vol. 68, № 3. – P. 326–335.
6. Ikeuchi, M. Plant regeneration: cellular origins and molecular mechanisms / M. Ikeuchi [et al.] // Development. – 2016. – Vol. 143. – P. 1 442–1 451.
7. Kusano, M. WIND1 induces dynamic metabolomic reprogramming during regeneration in *Brassica napus* / M. Kusano [et al.] // Dev. Biol. – 2018. – Vol. 442, № 1. – P. 40–52.
8. Greb, T., Lohmann J. U. Plant stem cells / T. Greb, J. U. Lohmann // Curr. Biol. – Vol. 26. – P. R816–R821.
9. Iwase, A. The AP2/ERF transcription factor WIND1 controls cell dedifferentiation in *Arabidopsis* / A. Iwase [et al.] // Curr. Biol. – 2011. – Vol. 21. – P. 508–514.
10. Iwase, A., Ohme-Takagi, M., Sugimoto, K. WIND1: a key molecular switch for plant cell dedifferentiation / A. Iwase, M. Ohme-Takagi, K. Sugimoto // Plant Signal. Behav. – 2011. – Vol. 6. – P. 1 943–1 945.
11. Ikeuchi, M., Sugimoto, K. Iwase, A. Plant callus: mechanisms of induction and re-pression / M. Ikeuchi, Sugimoto, K. Iwase A. // Plant Cell. – 2013. – Vol. 25. – P. 3 159–3 173.
12. Skoog, F. Miller, C. O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro / F. Skoog, C. O. Miller // Symp. Soc. Exp. Bio. – 1957. – Vol. 1. – P. 118–130.
13. Fehér A. Somatic embryogenesis — stress-induced remodeling of plant cell fate / A. Fehér // Biochim. Biophys. Acta. – 2015. – Vol. 1 849, № 4. – P. 385–402.
14. Horstman, A. M., Bemer, K., Boutilier, A. Transcriptional view on somatic embryogenesis regeneration / A. M. Horstman, K. Bemer, A. Boutilier // Regeneration (Oxf). – 2017. – Vol. 4, № 4. – P. 201–216.
15. Murashige, T., Skoog, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures / T. Murashige, F. A. Skoog // Physiol. Plant. – 1962. – Vol. 15. – P. 473–497.
16. Maheshwari, P., Selvaraj, G., Kovalchuk, I. Optimization of *Brassica napus* (canola) explant regeneration for genetic transformation / P. Maheshwari, G. Selvaraj, I. Kovalchuk // New Biotech. – 2011. – Vol. 29. – P. 144–155.
17. Cardoza, V. C. N., Stewart, Jr. / V. C. N. Cardoza, Jr. Stewart // Increased *Agrobacterium*-mediated transformation and rooting efficiencies in canola *Brassica napus* L. from hypocotyl segment explants // Plant Cell Rep. – 2003. – Vol. 21. – P. 599–604.
18. Susan, E., George, L. Plant regeneration from peduncle segments of oil seed *Brassica* species: Influence of silver nitrate and silver thiosulfate / E. Susan, L. George // Plant cell, tissue,

organ culture. – 1997. – Vol. 51. – P. 229–232.

19. Chi, G.-L., et al. Effect of AgNO₃ and aminoethoxyvinylglycine on *in vitro* shoot and root organogenesis from seedling explants of recalcitrant Brassica genotypes / G.-L. Chi [et al.] // Plant Cell Rep. – 1990. – Vol. 9. – P. 195–198.

20. Reda E. A. Moghaieb, et al. A reproducible protocol for regeneration and transformation in

canola (*Brassica napus* L.) // Afr. J. Biotech. – 2006. – Vol. 5, № 2. – P. 143–148.

21. Wang W. C., Menon G., Hansen G. Development of a novel Agrobacterium-mediated transformation method to recover transgenic Brassica napus plants // Plant Cell Rep. – 2003. – Vol. 22. – P. 274–281.

T. A. Gapeeva

COMPARATIVE ANALYSIS OF THE EFFICIENCY OF THE METHODS OF REGENERATION FROM RAPESEED EXPLANTS OF MAGNAT AND LEADER VARIETIES

State Scientific Institution

"Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus"

27 Akademicheskaya St., 220072 Minsk, Republic of Belarus

e-mail: tamaralex@mail.ru

A comparative analysis of the effectiveness of organogenesis from the callus cells of hypocotyl segment explants in rapeseed varieties Leader and Magnat regionalized in Belarus was carried out. It was established that the Leader, compared to the Magnat variety, is more suitable for organogenesis from plant explants *in vitro*. It was shown that for the Leader variety the regeneration efficiency is up to 10 plants adapted *ex vitro* per explant, when using a method, according to which hypocotyl explants are first exposed to auxin (2,4-dichlorophenoxyacetic acid, 1 mg/l), and then to cytokinin (6-benzylaminopurine, 5–8 mg/l).

Keywords: rapeseed, plant tissue culture, hypocotyl explants, morphogenesis *in vitro*, callus.

Дата поступления в редакцию: 1 сентября 2022 г.

Т. Г. Курьянчик, Н. В. Козел

ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ И СОДЕРЖАНИЕ СТРУКТУРНЫХ БЕЛКОВ ФОТОСИСТЕМ В ЛИСТЬЯХ ЯЧМЕНЯ В УСЛОВИЯХ ПОЧВЕННОЙ ЗАСУХИ

Государственное научное учреждение
«Институт биофизики и клеточной инженерии Национальной академии наук Беларуси»
Республика Беларусь, 220072, г. Минск, ул. Академическая, 27
e-mail: t.kuryanchyk@gmail.com

Показано существенное влияние почвенной засухи на экспрессию генов (*psaA*, *psaB*, *lhca2*, *psbA*, *lhcb1*, *lhcb4*), кодирующих ключевые структурные белки реакционных центров (РЦ) и светособирающих комплексов (ССК) фотосистем (ФС) в листьях растений ячменя. Наблюдаемое в условиях засухи изменение уровня экспрессии генов светозависимое: при нормальной освещенности происходит значительное увеличение экспрессии генов *lhcb1* (в 1,6 раз), *psaA* (в 1,8 раз) и *psaB* (в 2,5 раз), кодирующих белки ФС I и II, а при низкой, наоборот, наблюдается снижение экспрессии генов, кодирующих белки ФС II (*psbA*, *lhcb1*, *lhcb4*) и белок А (*psaA*) РЦ ФС I. Установлено, что в условиях засухи многократно увеличивается экспрессия гена *SOD3*, кодирующего хлоропластную изоформу антиоксидантного фермента супероксиддисмутазы (СОД) — Fe-СОД. Полученные данные указывают на индукцию засухой окислительного стресса в хлоропластах листьев растений ячменя.

Ключевые слова: экспрессия генов, ячмень, почвенная засуха, абиотический стресс, фотосинтез, белки фотосистем, СОД.

Введение

В связи с глобальным изменением климата в настоящее время дефицит воды является одним из основных экологических стрессовых факторов, который негативно влияет на урожайность сельскохозяйственных культур во всем мире и признан серьезной проблемой, угрожающей мировой продовольственной безопасности. Стресс, индуцированный засухой, вызывает изменения физиологических, морфологических, биохимических и молекулярных признаков растений, развивающихся параллельно [1], что отрицательно сказывается на росте и развитии последних. При этом многие растения в ответ на стрессовые воздействия окружающей среды развили различные механизмы, при помощи которых увеличивается их устойчивость. Однако эти механизмы являются компонентами сложных сигнальных путей, запускаемых какими-либо неблагоприятными внешними воздействиями, и зависят от вида, сорта растений, а также интенсивности, продолжительности и скорости развития стресса [2]. Поэтому сегодня большое значение имеет разработка перспективных страте-

гий получения культур, способных адаптироваться и переносить дефицит воды и в то же время достигать максимальной урожайности в этих стрессовых условиях.

Реакция растений на недостаток воды включает в себя очень сложную сеть, состоящую из множества путей, которые взаимосвязаны друг с другом на многих уровнях, что приводит к адаптации к стрессовым условиям окружающей среды [3]. В ответ на засуху растения частично или полностью закрывают устьица, тем самым ограничивая транспирацию воды из клеток [4]. Этот процесс является наиболее быстрым водосберегающим механизмом, который происходит за счет ограничения ассимиляции CO_2 , что чрезвычайно важно для производства органического вещества — крахмала, в процессе фотосинтеза [5–6]. Следовательно, более медленная или ингибированная ассимиляция CO_2 уменьшает скорость фотосинтеза — ключевого процесса первичного метаболизма растительной клетки, и негативно влияет на активность ФС за счет образования активных форм кислорода (АФК), которые ингибируют восстановление ФС II

[7]. Ранее нами было показано, что в растениях ячменя засуха индуцирует окислительный стресс через H_2O_2 -независимый механизм [8]. Это указывает на инициацию окислительного стресса по пути образования синглетного кислорода (1O_2), а не супероксидного радикала, являющегося предшественником H_2O_2 . В связи с этим можно предположить, что хлоропласты играют ключевую роль в развитии окислительных процессов в растениях ячменя при засухе. Наиболее вероятным механизмом индукции окислительного стресса в таких условиях может быть запуск пигментами-фотосенсибилизаторами в хлоропластных мембранах фотодинамических реакций второго типа [9].

Ячмень (*Hordeum vulgare* L.) занимает четвертое место по производству зерновых культур во всем мире после кукурузы, риса и пшеницы. Он широко используется в качестве корма для животных, а также в качестве сырья для солода и последующего производства пива. Ячмень также становится ценным компонентом здорового питания благодаря высокому содержанию в нем бета-глюкана. К тому же эта культура хорошо приспособлена к экстремальным условиям окружающей среды и, таким образом, может служить модельным объектом для понимания и изучения ответных реакций растений на изменения климата [10]. Одним из возможных способов повышения урожайности ячменя в неблагоприятных климатических условиях является оптимизация его фотосинтетической активности, регуляция которой генетически детерминирована [11].

Целью данной работы являлось изучение влияния почвенной засухи на экспрессию генов, кодирующих ключевые структурные белки РЦ и ССК ФС, а также содержание отдельных структурных белков ФС в листьях растений ячменя. Исследования проводили при культивировании растений в условиях разной освещенности для оценки роли хлоропластов в стрессовом ответе. В качестве маркеров окислительного стресса, индуцированного засухой, в листьях растений ячменя анализировали уровни экспрессии генов, кодирующих изоформы антиоксидантного фермента СОД, локализованные в разных компартментах клетки.

Материалы и методы

В качестве объекта исследования в данной

работе использовали зеленые проростки ячменя (*Hordeum vulgare* L.) сорта Аванс, выращенные в строго контролируемых лабораторных условиях в режиме 14 ч света (нормальная интенсивность 6 000 люкс, низкая — 2 000 люкс) и 10 ч темноты под люминесцентными лампами Philips TD-36/765 при температуре $23 \pm 1^\circ C$ и относительной влажности воздуха $35 \pm 2\%$ в нормальных условиях (ежедневный полив водопроводной водой из расчета 25 мл воды на 300 г влажного грунта) и при засухе (растения не поливали с момента посадки в почву). Семена растений ячменя предварительно проращивали на пластиковых асептически обработанных сетках при $23 \pm 1^\circ C$ в течение 1 сут. Затем отобранные по размеру корней семена высаживали в сосуды, заполненные 300 г влажного почвогрунта «Восторг» (ООО «Карио», Беларусь). Варианты эксперимента были следующими: «Контроль» (растения, выращенные в почве с поливом при нормальной интенсивности освещения); «Засуха» (растения, выращенные в почве без полива при нормальной интенсивности освещения); « $H_2O + LL$ » (растения, выращенные в почве с поливом при низкой интенсивности освещения, low light); «Засуха + LL» (растения, выращенные в почве без полива при низкой интенсивности освещения).

Для определения уровня экспрессии генов, кодирующих белки ФС и изоформы СОД, из листьев растений ячменя выделяли общую РНК с помощью реагента TRIzol GTM (AppliChem, Германия) по протоколу фирмы. Для получения кДНК на матрице РНК использовали реакцию обратной транскрипции с применением обратной транскриптазы вируса мышиной лейкемии Молони. Синтез проводили по стандартному протоколу фирмы с помощью набора реагентов ProtoScript II Reverse Transcriptase (BioLabs, США) в амплификаторе MJ Mini (Bio-Rad, США).

Расчет и дизайн праймеров, специфичных к генам, кодирующим основные структурные белки ФС и изоформы СОД растений ячменя, а также гена-нормализатора *actin*, проводили самостоятельно, используя последовательности мРНК выбранных генов, найденных в базе данных NCBI Nucleotide. Праймеры подбирали с наименьшим количеством шпилек, дуплексов, оптимальным соотношением GC-пар и минимальным различием в темпе-

ратурах плавления. Праймеры для гена-нормализатора *ubiq* (убиквитин) взяты из литературного источника [12]. Подобранные праймеры (табл. 1) были синтезированы ОДО «Праймтех» (Беларусь) (*actin*, *lhcb1*, *SOD2*), АО «ГенТерра» (Россия) (*psbA*, *lhcb4*, *psaA*,

psaB, *SOD1*, *SOD3*), ООО «Синтол» (Россия) (*lhca2*, *ubiq*).

Полимеразную цепную реакцию проводили в режиме реального времени (ПЦР-РВ) с использованием набора реагентов для проведения ПЦР-РВ в присутствии EVA Green (Син-

Таблица 1

Праймеры для генов, кодирующих основные структурные белки ФС и изоформы СОД в листьях растений ячменя

Ген	Последовательность олигонуклеотида, 5' → 3'	Длина продукта, п. н.	Температура отжига праймеров, °С	Количество циклов
<i>actin</i>	F-TCGTTTGGATCTCGCTGGTC R-TGAGGAGCTGTTCTTGGCAG GeneBank: XM_045114375.1	176	53,9	40
<i>ubiq</i>	F-GCAAGTAAGTGCCTGGTCATGA R-ACAACCAGACATGCTCCAACCT [12]	97	53,9	40
<i>psbA</i>	F-GTTTCCGTCTGGGTATGCG R-TGTTGTGCTCTGCCTGGAAT GeneBank: XM_045107918.1	174	60	40
<i>psaB</i>	F-CACATTATGGCAGGGCAACG R-AGAACATCCAAGCCCATACCG GeneBank: XM_045107913.1	155	58,3	40
<i>psaA</i>	F-AACGGGAACTCCGAGCAAAT R-GCTCCTGGTGCAACAACAAG GeneBank: XM_045107864.1	193	58,3	40
<i>lhcb1</i>	F-CACAGAGCATCCTCGCCATC R-AGGCGTCCGTTCTTGATCTC GeneBank: XM_045127826.1	196	53,9	40
<i>lhcb4</i>	F-CTCCTACTTCGACCCGCTG R-AGGTGTCGAAGATGGTGGTG GeneBank: XM_045109424.1	200	56,3	40
<i>lhca2</i>	F-GAGACTTCGGCTTTGACCCA R-CGTGTTGAGGATGCCGATCT GeneBank: X84308.1	155	57,0	40
<i>SOD1</i>	F-GGCGACCTGGGAAACATACA R-AACAACAAGTCCCTTCCCA GeneBank: XM_045126450.1	114	52,0	40
<i>SOD2</i>	F-ACCTCATGGCAAAGTTGGCT R-TGGTCACAAGAGGGTCCTGA GeneBank: XM_045112462.1	182	59,4	40
<i>SOD3</i>	F-TCTGGTTGGGTTTGGCTTGT R-TGTTCTGCTGTCGTCCTGT GeneBank: XM_045105431.1	162	63,9	45

Примечание. *actin* — актин, *ubiq* — полиубиквитин, *psbA* — D1-белок РЦ ФС II, *psaB* — В-белок РЦ ФС I, *psaA* — А-белок РЦ ФС I, *lhcb1* — белок внешней антенны ФС II, *lhcb4* — минорный белок антенны ФС II, *lhca2* — белок ССК ФС I, *SOD1* — изоформа Cu/Zn-СОД, *SOD2* — изоформа Mn-СОД, *SOD3* — изоформа Fe-СОД. Курсивом указан анализируемый ген, через знак «—» указано название белка, который кодирует ген

тол, Россия) на амплификаторе C1000 Touch с оптическим модулем CFX96 Touch (Bio-Rad, США). Реакционная смесь содержала 1 мкл dNTP 2,5 мМ, 1 мкл 10х ПЦР буфера Б, 1 мкл $MgCl_2$, 10 пмоль праймеров, 0,1 мкл SynTaq ДНК-полимеразы 5 Е/мкл, 1 мкл кДНК и воду, свободную от нуклеаз. Условия ПЦР-анализа: 1 этап: предварительная денатурация 5 мин при 95 °С; 2 этап: (40–45 циклов): денатурация — 15 сек при 95 °С, отжиг и элонгация — 45 сек при температуре отжига праймеров (табл. 1), 3 этап: (при необходимости) плавление ампликонов путем ступенчатого повышения температуры от 70 до 98 °С с интервалом 0,5 °С через каждые 5 сек.

Нормализацию исследуемых генов проводили по генам *actin* и *ubiq*. Расчет уровня экспрессии исследуемых генов проводили, используя метод Ливак [13]. Для этого определяли C_q — число циклов ПЦР, после которого кривые накопления ампликонов пересекаются с пороговой линией. Относительные нормализованные уровни экспрессии генов рассчитывали, используя программу Bio-Rad CFX Maestro, а также Excel 2019 (Microsoft). В качестве стандарта (1,0) брали экспрессию генов *ФС* и изоформ СОД в листьях ячменя сорта Аванс, выращенных в почве с поливом при 6 000 лк (вариант Контроль) того же возраста, что и экспериментальные растения.

Выделение из растений белков и их электрофоретическое разделение в полиакриламидном геле и вестерн-блоттинг выполняли, как описано в работе [14]. Навеску листьев ячменя массой 0,1 г растирали в жидком азоте до порошка, переносили в пробирку типа Эппендорф, приливали среду выделения, содержащую 56 мМ дитиотреитола, 56 мМ Na_2CO_3 , 12% сахарозы, 2 мМ этилендиаминтетраацетата, 2% додецилсульфата натрия и тщательно перемешивали, используя вортекс Vortex-Genie 2 (Scientific Industries, США). После этого пробы инкубировали в течение 10 мин при 80 °С на термошейкере TS-100 (SIA BIOSAN, Латвия). Затем снова перемешивали и центрифугировали в течение 5 мин при 17 000 g на центрифуге Biofuge PICO (Thermo Fisher Scientific, США). В полученном экстракте определяли содержание белка по методу Bredford [15] и при необходимости разбавляли пробы буфером для экстракции с целью вы-

равнивания в них содержания белка.

Разделение белков осуществляли с помощью денатурирующего гель-электрофореза. Форез проводили на установке для вертикального гель-электрофореза Mini-PROTEAN Tetra System (Bio RAD, США), используя коммерческие препараты разделяющего и концентрирующего гелей. После разделения белков осуществляли их электроперенос с геля на нитроцеллюлозную мембрану Bio RAD с порами 0,45 мкм. Гель помещали на мембрану и укладывали на поверхность системы турбоблоттинга Trans-Blot Turbo Transfer System (Bio RAD, США) между слоями хроматографической бумаги, предварительно смочив их в анодном буфере.

Иммунохимическое окрашивание белков, иммобилизованных на нитроцеллюлозной мембране, проводили с помощью поликлональных антител фирмы Agrisera (Швеция) на белок D1 РЦ ФС II, а также на белки ССК ФС I: *Lhca2* и ССК ФС II: *Lhcb2*, *Lhcb4*. Количество белков рассчитывали денситометрически в относительных единицах по площади и интенсивности полос после их визуализации, используя программу «TotalLab 2.01».

Для статистической обработки экспериментальных данных и регистрации полученных результатов использовали программы Excel 2019 (Microsoft) и Sigma Plot 12.5 (Systat software), а также статистические методы, принятые в области биологических исследований [16]. Основными статистическими характеристиками служили: средняя арифметическая величина ($\bar{x}$), среднее квадратическое отклонение (s), ошибка средней величины ($S_{\bar{x}}$). Достоверность различий между вариантами определяли с учетом коэффициента Стьюдента (t), для принятого уровня значимости ($p \leq 0,05$) и данного числа степеней свободы (df). Все описанные в работе эксперименты проводили в 4-кратной биологической повторности на 7 сут после высадки в почву пророщенных семян.

Результаты и обсуждение

В ходе исследования была проанализирована экспрессия шести генов, кодирующих белки ФС: *psaA* и *psaB*, кодирующие наиболее важные белки РЦ ФС I — А (83 кДа) и В (82,4 кДа) соответственно; *lhca2*, коди-

рующий хлорофилл-*a/b*-связывающий белок Lhca2 ССК ФС I; *psbA*, кодирующий полипептид D1 (38,8 кДа) центрального ядра ФС II; *lhcb1*, кодирующий белок Lhcb1 (28 кДа) внешней светособирающей антенны ФС II; *lhcb4*, кодирующий низкомолекулярный минорный белок Lhcb4 антенны ФС II (29 кДа), а также трех генов, кодирующих изоформы СОД: *SOD1* — Cu/Zn-СОД, основная изоформа СОД, локализованная практически во всех компартментах растительной клетки; *SOD2* — Mn-СОД изоформа, локализованная в митохондриях и пероксисомах; *SOD3* — изоформа Fe-СОД, локализованная преимущественно в хлоропластах высших растений. Был осуществлен подбор праймеров, специфичных к генам *psaA*, *psaB*, *lhca2*, *psbA*, *lhcb1*, *lhcb4*, *SOD1*, *SOD2*, *SOD3* и генам-нормали-

заторам *actin* и *ubiq* (табл. 1), оптимизирован протокол ПЦР-анализа для указанных праймеров и проведен ПЦР-РВ указанных генов в листьях ячменя сорта Аванс, выращенных в условиях засухи при различной освещенности. Полученные средние уровни экспрессии генов, кодирующих белки ФС и изоформы СОД в листьях, представлены на рисунке 1 и 2. За единицу принят уровень экспрессии генов в листьях растений ячменя, выращенных в почве с поливом при нормальной освещенности (Контроль).

Как видно из представленных данных, в варианте «Засуха» наблюдается значительное увеличение экспрессии генов *lhcb1* (увеличение экспрессии в 1,6 раз), *psaA* (увеличение экспрессии в 1,8 раз) и *psaB* (увеличение экспрессии в 2,5 раз), кодирующих белки ФС

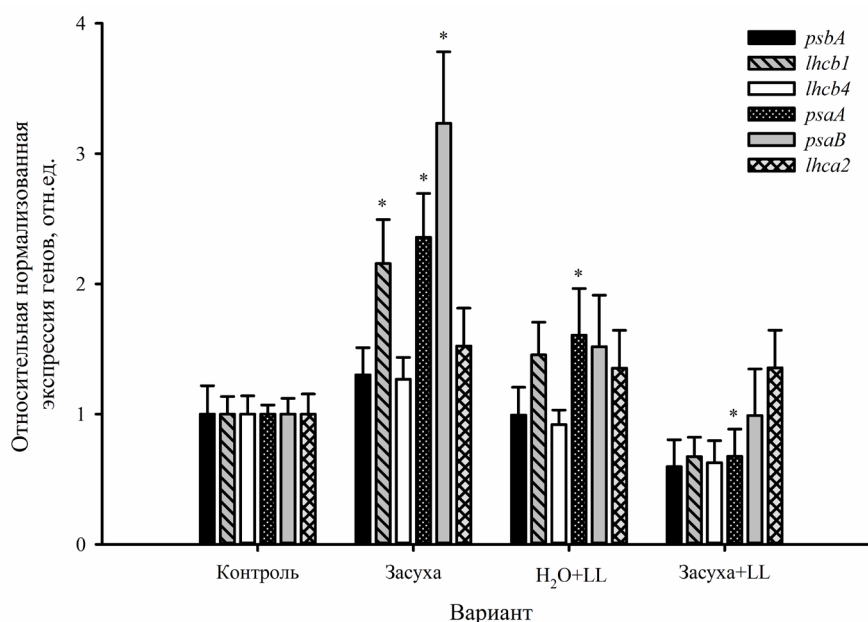


Рис. 1. Относительные нормализованные уровни экспрессии генов, кодирующих белки ФС, в листьях ячменя сорта Аванс, выращенных в условиях засухи при различной освещенности

* — различия по сравнению с контролем достоверны, $p \leq 0,05$

I и II, по сравнению с контрольным вариантом. Экспрессия остальных генов (*psbA*, *lhcb4*, *lhca2*) недостоверно увеличивалась относительно контроля (рис. 1).

В варианте, выращенном при нормальном водообеспечении и низкой интенсивности света, также отмечено некоторое увеличение экспрессии генов, кодирующих белки ФС, но это увеличение статистически не отличается от контроля, за исключением гена *psaA*, коди-

рующего белок А РЦ ФС I, экспрессия которого достоверно увеличивается в 1,4 раза по сравнению с контролем. При этом в варианте «Засуха + LL» наоборот, наблюдалась тенденция к снижению экспрессии генов, кодирующих белки ФС II (*psbA*, *lhcb1*, *lhcb4*) и белка А (*psaA*) РЦ ФС I, уровень *psaB* и *lhca2* не изменялся или изменялся незначительно в пределах погрешности (рис. 1).

Неблагоприятные факторы окружающей

среды, в том числе и засуха, активизируют в клетках растений образование высокореактивных и цитотоксичных молекул — АФК, что может приводить к нарушению структуры основных макромолекул и развитию окислительного стресса [17]. Одной из первых защитных реакций растений, направленных на нейтрализацию АФК и предотвращение окислительного стресса, является активизация работы антиоксидантной системы [18]. Среди множества высоко- и низкомолекулярных протекторных соединений особую роль в защите растений от окислительного стресса играет фермент СОД, так как именно он способен преобразовывать супероксидный анион-радикал с образованием молекулярного кислорода

и пероксида водорода.

В нашем исследовании показано, что в условиях засухи на 7 сут выращивания многократно (в 6–7 раз) увеличивается экспрессия гена *SOD3*, кодирующего хлоропластную изоформу Fe-СОД (рис. 2). Такое повышение активности Fe-СОД, возможно, является непосредственным ответом на развивающийся окислительный стресс и образование супероксидного анион-радикала в частности, и может указывать на участие данного фермента в процессах формирования повышенной устойчивости растений ячменя к дефициту воды в почве. Что касается двух других изоформ СОД — Cu/Zn-СОД и Mn-СОД, то их экспрессия (*SOD1* и *SOD2*) была значительно ниже, чем Fe-СОД, и оста-

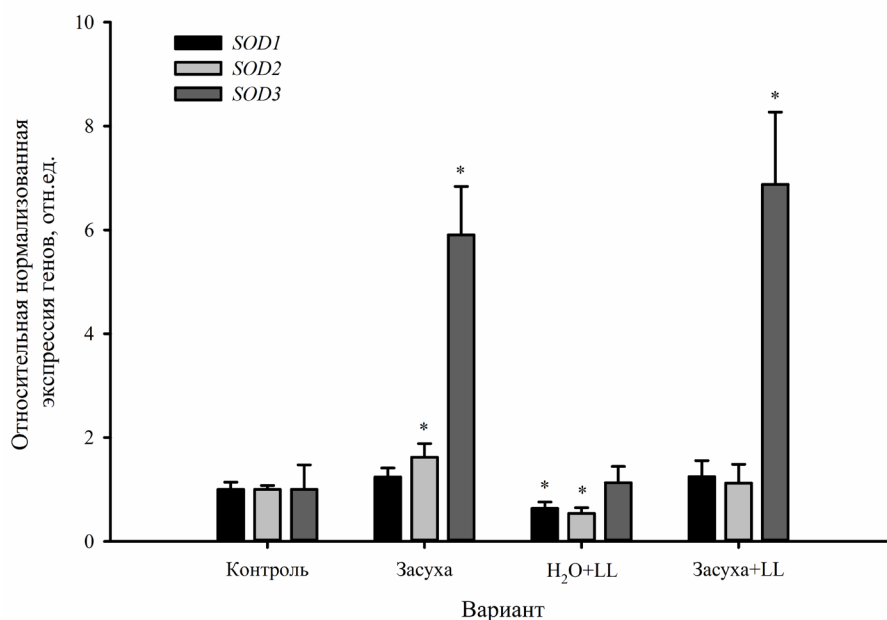


Рис. 2. Относительные нормализованные уровни экспрессии генов, кодирующих изоформы СОД в листьях ячменя сорта Аванс, выращенных в условиях засухи при различной освещенности

* — различия по сравнению с контролем достоверны, $p \leq 0,05$

валась на уровне контроля (рис. 2).

Можно предположить, что вклад различных изоформ фермента в общую активность СОД неодинаков. Учитывая, что Fe-СОД преимущественно локализован в хлоропластах, большая экспрессия гена *SOD3*, кодирующего Fe-СОД, может быть связана с необходимостью увеличения активности данного изофермента для обеспечения защиты хлоропластов и одного из важнейших и наиболее стрессочувствительных процессов — фотосинтеза [19].

Также в ходе работы был проведен анализ

содержания структурных белков пигмент-белковых комплексов ФС II (PsbA, Lhcb2, Lhcb4) и ФС I (Lhca2). Достоверных различий между вариантами по сравнению с контролем не обнаружено, однако в варианте «Засуха + LL» наблюдается некоторое снижение количества белков пигмент-белковых комплексов ФС, за исключением белка внешней антенны Lhcb2 ФС II (рис. 3). При этом отметим, что если для варианта «Засуха + LL» наблюдалась тенденция к снижению количества структурных белков ФС, то для варианта «Засуха», наоборот,

регистрировали тенденцию к увеличению содержания исследованных белков, в частности белков Lhcb4 и Lhca2, что соответствует в целом результатам анализа уровня экспрессии генов, кодирующих белки ФС. Отсутствие прямой корреляции между уровнем экспрессии

проанализированных генов и содержанием отдельных структурных белков фотосинтетического аппарата, видимо, связано с неодинаковой чувствительностью последних к окислительному воздействию и, соответственно, неравномерной деградацией их в условиях стресса.

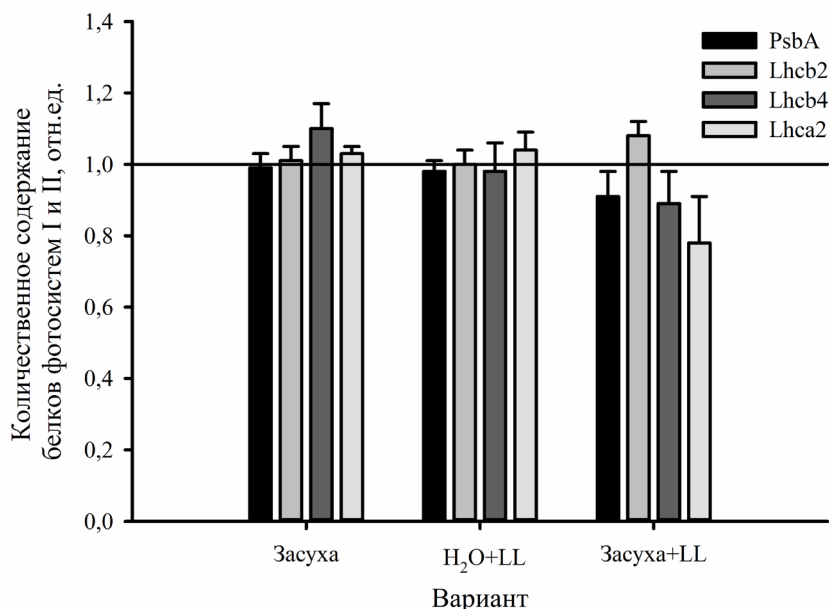


Рис. 3. Содержание белков ФС I и ФС II в листьях растений ячменя, выращенных в условиях почвенной засухи при различной освещенности. Контроль принят за 1 и представлен базовой линией

Таким образом, полученные данные демонстрируют индукцию засухой окислительного стресса в хлоропластах листьев растений ячменя. На это указывает существенное увеличение уровня экспрессии гена *SOD3*, кодирующего хлоропластную изоформу СОД — Fe-СОД, по сравнению с *SOD1* и *SOD2*, а также светозависимое изменение уровня экспрессии проанализированных генов, кодирующих белки ФС, и количества отдельных структурных белков ФС в условиях засухи. Увеличение уровня экспрессии генов и содержания белков комплексов ФС может приводить к увеличению размера светособирающей антенны, что потенциально опасно развитием деструктивных процессов в хлоропластных мембранах, так как хлоропластная электрон-транспортная цепь является основным поставщиком АФК в растительной клетке при абиотическом стрессе. Активация фотосинтеза в стрессовых условиях приводит к увеличению продукции АФК. Для сорта Аванс это может быть ключевым фактором, определяющим его относи-

тельно низкую засухоустойчивость [20].

На основании представленных данных, а также результатов, полученных нами ранее, демонстрирующих H_2O_2 -независимый механизм индукции окислительного стресса [8], мы предполагаем, что стресс, вызванный засухой в листьях растений ячменя, запускается в хлоропластах пигментами-фотосенсибилизаторами продуцирующими 1O_2 [21]. Образованию 1O_2 в фотосинтетической мембране при засухе может способствовать нарушение переноса электронов в электронтранспортной цепи вследствие ограничения ассимиляции CO_2 и/или снижения интенсивности работы кислород-выделяющего комплекса из-за дефицита H_2O . Согласно современным представлениям, 1O_2 является высокореакционной АФК, приводящей к окислительному повреждению клеточных компонентов. Кроме того, в сублетальных концентрациях 1O_2 также участвует в сигнализации, инициируя передачу сигнала от хлоропласта в ядро [21, 22]. Соответственно, наблюдаемое нами изменение экспрессии

генов, кодирующих ключевые структурные белки ФС, а также хлоропластную изоформу антиоксидантного фермента СОД — Fe-СОД, в листьях растений ячменя может быть связано с $^1\text{O}_2$ -зависимой сигнализацией.

Заключение

Показано существенное влияние почвенной засухи на экспрессию генов (*psaA*, *psaB*, *lhca2*, *psbA*, *lhcb1*, *lhcb4*), кодирующих ключевые структурные белки РЦ и ССК ФС в листьях растений ячменя. Наблюдаемое в условиях засухи изменение уровня экспрессии генов светозависимое — при нормальной освещенности происходит значительное увеличение экспрессии генов *lhcb1* (в 1,6 раз), *psaA* (в 1,8 раз) и *psaB* (в 2,5 раз), кодирующих белки ФС I и II, а при низкой, наоборот, наблюдается снижение экспрессии генов, кодирующих белки ФС II (*psbA*, *lhcb1*, *lhcb4*) и белок А (*psaA*) РЦ ФС I. Выявлена тенденция к увеличению количества отдельных структурных белков ФС для варианта «Засуха», а для варианта «Засуха + LL», наоборот, регистрировали тенденцию к снижению содержания исследованных белков. Установлено, что в условиях засухи многократно увеличивается экспрессия гена *SOD3*, кодирующего хлоропластную изоформу Fe-СОД, при незначительном изменении уровня экспрессии *SOD1* и *SOD2*. Полученные данные указывают на индукцию засухой окислительного стресса в хлоропластах листьев растений ячменя.

Список использованных источников

1. Chaves, M. M. Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell / M. M. Chaves, J. Flexas, C. Pinheiro // *Ann. Bot.-London*. — 2009. — Vol. 103, № 4. — P. 551–560.
2. Knight, H. Abiotic stress signaling pathways: specificity and cross-talk / H. Knight, M. R. Knight // *Trends Plant Sci*. — 2001. — Vol. 6, № 6. — P. 262–267.
3. Genetic and physiological dissection of photosynthesis in barley exposed to drought stress / A. Daszkowska-Golec [et al.] // *J. Mol. Sci*. — 2019. — Vol. 20. — Art. 6341.
4. Xu, Z. Responses of leaf stomatal density to water status and its relationship with photosynthesis in a grass / Z. Xu, G. Zhou // *J. Exp. Bot*. — 2008. — Vol. 59. — P. 3 317–3 325.
5. Mesophyll ABA restrains early growth and flowering but does not directly suppress photosynthesis / Negin, B. [et al.] // *Plant Physiol*. — 2019. — Vol. 180. — P. 910–925.
6. Lawson, T. Speedy stomata, photosynthesis and plant water use efficiency / T. Lawson, S. Violet-Chabrand // *New Phytol*. — 2019. — Vol. 221. — P. 93–98.
7. Gururani, M. A. Regulation of photosynthesis during abiotic stress-induced photoinhibition / M. A. Gururani, J. Venkatesh, L. S. P. Tran // *Mol. Plant*. — 2015. — Vol. 8. — P. 1 304–1 320.
8. Курьянчик, Т. Г. H_2O_2 -независимый механизм индукции окислительного стресса в листьях растений ячменя в условиях засухи / Т. Г. Курьянчик, Н. В. Козел // Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем. К 100-летию белорусской академической науки [Электронный ресурс] : тез. докл. междунар. науч. конф., Пятнадцатого съезда Белорус. обществ. об-ния фотобиологов и биофизиков, Респ. Беларусь, Минск, 15–17 июня 2022 г. / Белорус. гос. ун-т ; редкол.: И. Д. Волотовский (гл. ред.) [и др.]. — Минск : БГУ, 2022. — 34 с.
9. Фотодинамические процессы с участием триплетного состояния порфириновых сенсibilizаторов / А. П. Лосев [и др.] // Фотобиология и мембранная биофизика / Н. Г. Аверина [и др.]; под ред. И. Д. Волотовского. — Минск : «Технопринт», 1999. — Гл. 15. — С. 268–285.
10. Tansley review barley: a translational model for adaptation to climate change / I. K. Dawson [et al.] // *New Phytol*. — 2015. — Vol. 206. — P. 913–931.
11. Genome-wide associations of chlorophyll fluorescence OJIP transient parameters connected with soil drought response in barley / M. Rapacz [et al.] // *Front. Plant. Sci*. — 2019. — Vol. 10. — Art. 78.
12. Технология ДНК-типирования генов устойчивости ячменя к засухе : методические указания / И. Н. Доманская [и др.]. — Минск : Право и экономика, 2011. — 31 с.
13. Livak, K. J. Analysis of relative gene expression data using realtime quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ Method / K. J. Livak, T. D. Schmittgen // *Methods*. — 2001. — P. 402–408.
14. Antenna protein composition of PS I and PS II in thylakoid sub-domains / S. Jansson [et al.] // *Biochim. Biophys. Acta*. — 1997. — Vol. 1 320,

№ 3. – P. 297–309.

15. Bradford, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding / M. Bradford // *Anal. Biochem.* – 1976. – Vol. 72. – P. 248–254.

16. Рокицкий, П. Ф. Биологическая статистика / П. Ф. Рокицкий. – Минск, 1973. – С. 28–50.

17. Secondary metabolites in the drought stress tolerance of crop plants: A review / B. Yadav [et al.] // *Gene Reports.* – 2021. – Vol. 23. – Art. 101040. <https://doi.org/10.1016/j.genrep.2021.101040>.

18. Demidchik, V. Mechanisms of oxidative stress in plants: From classical chemistry to cell biology / V. Demidchik // *Environmental and Experimental Botany.* – 2015. – Vol. 109. – P. 212–228.

19. Динамика активности супероксиддисмутазы и экспрессии кодирующих ее генов в ли-

стьях пшеницы при холодовой адаптации / Н. С. Репкина [и др.] // *Труды Карельского научного центра российской академии наук.* — 2017. – № 5. – С. 89–98

20. Курьянчик, Т. Г. 5-аминолевулиновая кислота как протектор фотосинтетического аппарата растений ячменя при засухе / Т. Г. Курьянчик, // *Новости науки в АПК.* – 2021. – № 2. – С. 323–330. <https://doi.org/10.25930/2218-855x/090.2.2021>.

21. Dmitrieva, V. A. Singlet Oxygen in Plants: Generation, Detection, and Signaling Roles / V. A. Dmitrieva, E. V. Tyutereva, O. V. Voitsek-hovskaja // *Int J Mol Sci.* – 2020. – Vol. 21, №. 9. – Art. 3237. <https://doi.org/10.3390/ijms21093237>.

22. Dogra, V. Singlet Oxygen Metabolism: From Genesis to Signaling / V. Dogra, C. Kim // *Front Plant Sci.* – 2019. – Vol. 10. – Art. 1640. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01640>.

T. G. Kuryanchyk, N. V. Kozel

GENE EXPRESSION AND THE CONTENT OF STRUCTURAL PROTEINS OF PHOTOSYSTEMS IN BARLEY LEAVES UNDER SOIL DROUGHT

State Scientific Institution

"Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus"

27 Akademicheskaya St., 220072 Minsk, Republic of Belarus

e-mail: t.kuryanchyk@gmail.com

A significant effect of soil drought on the gene expression (*psaA*, *psaB*, *lhca2*, *psbA*, *lhcb1* and *lhcb4*) encoding key structural proteins of reaction centers (RC) and light harvesting complexes (LHC) of photosystems (PS) in barley leaves was shown. A change in the level of gene expression observed under drought conditions is light-dependent — in normal light, there is a significant increase in the expression of *lhcb1* (1.6 times), *psaA* (1.8 times) and *psaB* (2.5 times) genes, encoding PS I and II proteins, and in the dim light, on the contrary, there is a decrease in the expression of genes encoding the proteins PS II (*psbA*, *lhcb1* and *lhcb4*) and protein A (*psaA*) of the PS I RC. It was found that under drought conditions the expression of the gene *SOD3* encoding the chloroplast isoform of the antioxidant superoxide dismutase (SOD) enzyme Fe-SOD increases multiple times. The data obtained indicate the induction of oxidative stress by drought in the chloroplasts of the leaves of barley plants.

Keywords: gene expression, barley, soil drought, abiotic stress, photosynthesis, photosystem proteins, SOD.

Дата поступления в редакцию: 29 июля 2022 г.

А. М. Шишлова-Соколовская, Е. П. Хмилевская, О. Ю. Урбанович

РАЗРАБОТКА CRISPR/CAS9 СИСТЕМЫ ДЛЯ ГЕНОМНОГО РЕДАКТИРОВАНИЯ ГЕНА *NTPDS* ТАБАКА (*NICOTIANA TABACUM*)

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

CRISPR/Cas9 система является одним из мощнейших инструментов для редактирования геномов растений. В представленном исследовании векторные конструкции, разработанные на основе CRISPR/Cas9 системы, были использованы для редактирования генома *Nicotiana tabacum*. В качестве мишени выбран ген *NtPDS*, кодирующий фермент 15-цис-фитоендесатуразу. Нокаут данного гена в растениях приводит к фенотипу альбиносов и карликовости. С помощью биоинформатических платформ *in silico* было смоделировано 3 векторные конструкции на основе бинарного вектора *pRGEB31:pRGEB31 + gRNA5-pds*, *pRGEB31 + gRNAJp2-pds*, *pRGEB31 + gRNADeT186-pds*, несущие в своем составе систему CRISPR/Cas9 со спейсерами к различным участкам структурных доменов гена *NtPDS*. Векторные конструкции были собраны, используя методы молекулярного клонирования. Правильность и корректность их сборки подтверждена методом секвенирования по Сэнгеру. Посредством *Agrobacterium*-опосредованной трансформации листовых дисков данные генетические конструкции были введены в геном модельного объекта *N. tabacum* cv. *Petit Havana SR1*. В процессе культивирования листовых дисков табака удалось инициировать процессы каллусогенеза и морфогенеза при использовании каждого из вариантов конструкций, однако максимальная их частота наблюдалась при использовании конструкции *pRGEB31 + gRNA5-pds*.

Ключевые слова: CRISPR/Cas9 система, гидовая РНК, РАМ, *pRGEB31*, *NtPDS*, *Nicotiana tabacum*.

Введение

Геномное редактирование является одним из методов генетической инженерии, с помощью которого возможно включение, удаление или перемещение фрагментов ДНК в геноме организма посредством специфически спроектированных эндонуклеаз [1–3]. В настоящее время система CRISPR/Cas9 (clustered regulatory inter spaced short palindromic repeats — короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами) является одним из мощнейших, наиболее эффективных, простых и универсальных в использовании инструментов для редактирования геномов растений [4, 5]. CRISPR/Cas9 система состоит из 2 компонентов: гидовой (направляющей) РНК (гидРНК) и эндонуклеазы Cas9. Последовательность гидРНК состоит из константной тракрРНК (70 п. о.) и вариательной крРНК (17–25 п. о.) части. Константная часть необходима для связывания с нуклеазой Cas9, вариательная — для специфического связыва-

ния комплекса гидРНК/Cas9 с последовательностью мишени, подлежащей модификации [6, 7]. Сигналом для специфического связывания белка Cas9 с мишенью служит последовательность РАМ, состоящая из 3 нуклеотидов (5'-NGG-3') и примыкающая к 3'-концевому участку мишени [8]. Нуклеаза Cas9 распознает РАМ и вносит разрывы на ~3–4 нуклеотида ниже данной последовательности. Наличие последовательности РАМ является единственным ограничением при выборе мишени для редактирования генома с помощью CRISPR/Cas9 системы. Транскрипционная активность комплекса гидРНК/Cas9 в клетке приводит к множеству разнообразных мутаций, таких как делеции, вставки, мутации со сдвигом рамки считывания, что, в свою очередь, вызывает нарушения в нуклеотидной последовательности и, как следствие, потерю функции гена-мишени [9].

Мишенью для редактирования может быть любая последовательность ДНК длиной

17–23 нуклеотидов при условии, что является уникальной для выбранного генома и на 3'-конце имеет последовательность РАМ. Для дизайна гидРНК на сегодняшний день создан ряд биоинформатических онлайн ресурсов, позволяющих подобрать не только высокоспецифичные спейсеры, но и выявить вероятные off-target сайты [10–12]. У растений при использовании CRISPR/Cas9 системы, в отличие от других объектов, ошибочные мутации возникают редко или не выявляются совсем, а тщательный подбор гидРНК позволяет существенно снизить риск off-target эффектов [13–15].

Важную роль в редактировании растительного генома играет метод доставки компонентов системы CRISPR/Cas9 [16]. Сегодня широко применяются два основных метода доставки — это биобаллистика и *Agrobacterium*-опосредованная трансформация. Метод биобаллистики был применен для редактирования генома пшеницы, риса, кукурузы, сои, томата [17–19]. С помощью *Agrobacterium*-опосредованной трансформации, как способа для доставки компонентов CRISPR/Cas9 системы, были получены нокаут-мутанты как двудольных, так и однодольных [20, 21].

Целью данной работы была разработка векторных конструкций на основе CRISPR/Cas9 системы для редактирования растительного генома на примере модельного объекта *N. tabacum*. В качестве мишени выбран ген *NtPDS*, кодирующий фермент 15-цис-фитендесатуразу.

Материалы и методы

В качестве объекта в наших исследованиях

использовалась линия табака *Nicotiana tabacum* cv. *Petit Havana SRI*, предметом исследования являлся ген *NtPDS* (Gene ID:107816873, updated on 13-Dec-2019) *N. tabacum*.

Создание векторных конструкций

Векторные конструкции для трансформации растений были созданы на основе бинарного вектора *pRGE31* [22]. При создании векторных конструкций были использованы общепринятые методики выделения и очистки плазмидной ДНК, ферментативного гидролиза, дефосфорилирования рестрицированных фрагментов и лигирования, выполненные с применением коммерческих наборов реагентов Thermo Fisher Scientific по методикам изготовителя. Ферментативное расщепление плазмидной ДНК проводили по двойному сайту эндонуклеазы рестрикции *BsaI* (Thermo Fisher Scientific). Рестрицированную смесь разделяли посредством электрофореза в 1% агарозном геле с последующим выделением из геля и очисткой фрагмента нужного размера с помощью набора реагентов GeneJET Extraction and DNA Clean up Micro Kit (Thermo Fisher Scientific).

Для дизайна векторных конструкций *in silico* в нашей работе были использованы следующие программы: Snap Gene Viewer 6.0, Unipro UGENE 41.0, ApE (A plasmid Editor).

Корректность и правильность сборки векторных конструкций подтверждалась методами ПЦР и секвенированием по Сэнгеру с использованием синтетических олигонуклеотидов (синтезированы компанией Праймтех) (табл. 1).

Секвенирование по Сэнгеру было выполнено на генетическом анализаторе Genetic Analyzer 3500 (Applied Biosystems) с помощью

Таблица 1

Последовательность и температура отжига синтетических олигонуклеотидов, использованных при создании и анализе векторных конструкций

Олигонуклеотиды	Последовательность синтетических олигонуклеотидов, 5' → 3'	Температура отжига, °C
gRNA5-F	GGCAGCTGCATGGAAAGATGATGA	55 °C
gRNA5-R	AAACTCATCATCTTTCATGCAGC	54 °C
gRNADeT186-F	GGCAAAGGACTTTAATCCTTTAA	56 °C
gRNADeT186-R	AAACTTAAAGGATTAAAGTCCTT	54 °C
gRNAJp2-F	GGCAGAGAACTAGGGATAAACGAT	56 °C

Окончание таблицы 1

Олигонуклеотиды	Последовательность синтетических олигонуклеотидов, 5' → 3'	Температура отжига, °C
gRNA _{Ip2} -R	AAACATCGTTTATCCCTAGTTCTC	52 °C
U3Cas9-F	AAGGAATCTTTAAACATACG	48 °C
U3Cas9-R	CTTTTCTTTTTCCTGGC	53 °C
gRNA-F	AAGAGTTGTGCAGATGATCC	56 °C
gRNA-R	ATCTGGGGACCTGCAGGCAT	56 °C

набора реагентов Brilliant Dye™ Terminator Cycle Sequencing Kit v.2.1 (Nima Gen, EU) по протоколу изготовителя. Анализ полученных нуклеотидных последовательностей выполняли с помощью программы Snap Gene Viewer 6.0 и базы данных NCBI.

Дизайн и синтез спейсерных последовательностей

Дизайн спейсерных последовательностей к различным протоспейсерам гена-мишени *NtPDS* был выполнен с использованием следующих онлайн программ: CRISPR direct, CRISPOR, CCTop. Для клонирования спейсеров в бинарный вектор *pRGEB31* к 5'-концевым участкам праймеров были добавлены липкие концы: для прямого праймера — 5'-GGC-3' (если начинается с А) или 5'-GGCA-3' (если начинается с G/C/T), для обратного праймера — 5'-AAAC-3'. Формирование спейсерных последовательностей проводили по следующему протоколу: смесь из 1 мкл каждого из праймеров в концентрации 100 мкМ, 1 мкл 10 X Buffer for T4 DNA ligase (Thermo Fisher Scientific) и 7 мкл воды miliQ, инкубировали 60 мин при 37 °C, затем 10 мин при 95 °C с последующим охлаждением до 25 °C 1 °C/1 мин. Синтезированные таким способом дуплексы далее были клонированы в вектор *pRGEB31* по двойному сайту эндонуклеазы рестрикции *BsaI*. Полученные плазмиды посредством метода теплового шока вводили в компетентные клетки *E. Coli* (XL1-Blue, DH5α). Конъюгацию плазмид из *E. Coli* (XL1-Blue, DH5α) в *Agrobacterium tumefaciens* (EHA105, LBA4404) осуществляли методом трехродительского скрещивания.

Молекулярно-генетический анализ

Для идентификации гена эндонуклеазы Cas9, гидРНК и регуляторных элементов в бинарном векторе *pRGEB31* был использован ПЦР анализ с помощью праймеров, разработанных

в программе Snap Gene Viewer 6.0, Unipro UGENE 41.0 (табл. 1).

Объем смеси для амплификации одного образца составлял 25 мкл, в смесь входили следующие реагенты: 100 нг ДНК, 2,5 мкл 10X буфера с (NH₄)₂SO₄ (Thermo Fisher Scientific), 2,5 мкл 10 мМ смеси нуклеотидов (dNTP) (Thermo Fisher Scientific), 2 мкл 25 мМ MgCl₂ (Thermo Fisher Scientific), 2,5 мкл каждого из праймеров, 0,2 мкл 5 ед. Taq ДНК-полимеразы (Праймтех), 10,7 мкл H₂O. Амплификацию проводили в амплификаторе BioRad с использованием следующей программы: денатурация — 94 °C 4 мин; затем 35 циклов — 94 °C 30 сек, температура отжига праймеров (согласно табл. 1) — 45 сек, 72 °C — 1 мин; ренатурация — 72 °C 7 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. Для более достоверного анализа ПЦР продуктов проводили разделение фрагментов ДНК в 6% полиакриламидном геле (ПААГ) с помощью камеры для вертикального электрофореза фирмы «BioRad». Продукты ПЦР разделяли в течение 2 ч при напряжении 280 В с предварительным прогоном геля в течение 1 ч при 100 В. Гель окрашивали раствором бромистого этидия в концентрации 0,5 мг/л 15–20 мин. После окрашивания визуализировали с помощью системы BioRad GelDoc2000.

Agrobacterium-опосредованная трансформация и морфогенез в культуре *in vitro*

Культивирование ночной культуры *A. tumefaciens* штаммов EHA105, LBA4404 проводилось в темноте в течение 24 ч при 24 °C в 20 мл жидкой среды LB с добавле-

нием антибиотиков канамицина и рифампицина в концентрациях 50 мг/л и 100 мг/л, соответственно. С помощью полученной агробактериальной суспензии проводили инфицирование эксплантов. В качестве эксплантов использовались листья 3–4-недельных растений табака, выращенных в асептических условиях. Подготовленная агробактериальная суспензия втиралась легкими движениями в среду для кокультивации и предварительно нарезанные растительные экспланты размером $0,3\text{--}0,5 \times 0,3\text{--}0,5$ см выкладывались на агаризованную среду SIM (0,2 мг/л БАП, 1 мг/л НУК) и кокультивировались в течение 24–48 ч в темноте при $t = 25^\circ\text{C}$ без селекции. Далее экспланты переносились на селективную среду SIM (1 мг/л БАП, 0,1 мг/л НУК) для инициации процессов тканевой дедифференциации и каллусогенеза, содержащую антибиотик гигромицин в концентрации 10 мг/л при $24/18^\circ\text{C}$, 16/8-часовом фотопериоде при освещенности порядка 2 000–3 000 люкс.

Результаты и их обсуждение

Сегодня эффективным и новейшим методом редактирования растительного генома является система CRISPR/Cas9. Одним из ключевых моментов геномного редактирования является выбор мишени, который непосредственно сопряжен с дизайном гидовой РНК [23–25].

В нашей работе в качестве гена-мишени мы использовали ген *NtPDS* *N. tabacum*, кодирующий фермент 15-цис-фитоендесатуразу. 15-цис-фитоендесатураза является ключевым ферментом биосинтеза каротиноидов. Предполагается, что каротиноиды в фотосинтетических системах предотвращают повреждения, вызываемые образованием синглетного кислорода, за счет диссипации избыточной световой энергии, путем дезактивации возбужденных молекул хлорофилла в триплетном состоянии или путем прямого тушения молекул синглетного кислорода [26, 27]. Любые изменения в работе данного фермента, а в нашем случае нокаут гена *NtPDS*, приведут к фенотипу альбинизма и карликовости у растений за счет нарушения биосинтеза хлорофилла, каротиноидов и гиббереллинов [28, 29]. Следовательно, ген *NtPDS* является удобной мишенью для CRISPR/Cas9-опосредованного нокаута генов у различных видов растений,

так как позволяет обнаружить генетически измененные растения по фенотипу и относительно легко оценить эффективность работы векторных конструкций [30–33].

Последовательности высокоспецифичных направляющих спейсерных РНК для нокаута гена *NtPDS* были нами разработаны на основе эталонной последовательности генома *N. tabacum* (NCBIID: 425) и с использованием инструментов анализа генома и гена-мишени CRISPRdirect, CRISPOR, CCTop. Успешное использование данных программ и онлайн ресурсов для подбора гидРНК с высокой степенью специфичности и минимальными off-target эффектами было показано в ряде зарубежных работ [34, 35]. При использовании выше описанных биоинформатических платформ было выбрано 3 высокоспецифичные гидРНК (20 п. н.) с минимальными off-target эффектами, и для формирования спейсерных дуплексов гидРНК были смоделированы праймеры с помощью программ SnapGene Viewer 6.0, Unipro UGENE 41.0, ApE (A plasmid Editor) — gRNA5, gRNAJp 2, gRNADeT186 (табл. 1).

Соответствие выбранных гидРНК различным протоспейсерам мишени и наличие примыкающей к спейсеру последовательности PAM (5'-NGG-3') было показано *in silico*: gRNA5 комплементарна протоспейсеру, находящемуся в 5 экзоне гена *NtPDS* (3 085–3 105 п. о.), gRNAJp2 — в 6 экзоне (3 384–3 402 п. о.), gRNADeT186 — во 2 экзоне (985–1 004 п. о.). В результате с помощью выбранных гидРНК нами было сконструировано 3 векторные конструкции: *pRGEB31* + *gRNA-pds* (gRNA варьирует в зависимости от спейсерной последовательности). Дуплексы гидРНК были синтезированы с помощью синтетических олигонуклеотидов (раздел «Материалы и методы»), после чего по двойному сайту эндонуклеазы рестрикции *BsaI* были клонированы в бинарный вектор *pRGEB31* (рис. 1)

В эукариотических клетках Cas9 экспрессируется, как правило, со стандартных промоторов, таких как CaMV, а гидРНК, в свою очередь, с U3 или U6 промоторов. В нашем случае мы используем бинарный вектор *pRGEB31* для совместной экспрессии гена *Cas9* под контролем CaMV 35S промотора и последовательности гидРНК под U3 промотором. Для образования рибонуклеинового

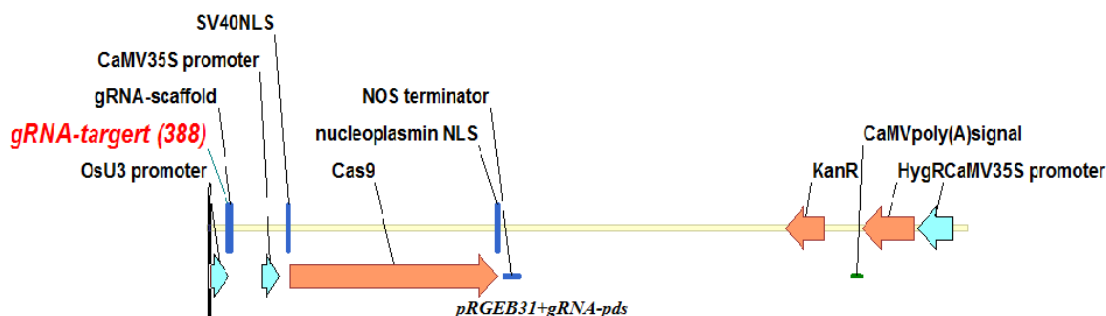


Рис. 1. Схема плазмиды *pRGE31 + gRNA-pds*, содержащей gRNA, комплементарную протоспейсеру гена *NtPDS*: gRNA-target — спейсер, комплементарный выбранному протоспейсеру мишени; OsU3 promoter — *Oryza sativa* U3 промотор; gRNA scaffold — константная часть гидРНК; CaMV 35S promoter — конститутивный промотор вируса мозаики цветной капусты; Cas9 — Cas9 (Csn1) эндонуклеаза из *Streptococcus pyogenes* TypeII CRISPR/Cas system; NOS terminator — нопалинсинтазный терминатор; Nucleoplasm NLS — двойной сигнал ядерной локализации

комплекса Cas9/гидРНК в нашей конструкции ген *Cas9* слит с сигналом клеточной локализации (NLS), т. к. в отличие от гидРНК мРНК *Cas9* транслируется в цитозоле, после чего уже белок *Cas9* возвращается в ядро. Попав в ядро, белок *Cas9* образует рибонуклеиновый комплекс с гидРНК, способный специфично расщеплять ДНК [36, 37].

Полученные векторные конструкции методом теплового шока были введены в компетентные клетки *E. coli* XL1-Blue, DH5α. Для первичного скрининга трансфор-

мированных колоний *E. coli* мы использовали ПЦР анализ со специфическими праймерами (табл. 1), амплифицирующими фрагмент размером 555 п. о., содержащий U3 промотор, константную и варируемую части гидРНК с последующим разделением в 1% агарозном геле (рис. 2).

Из электрофореграммы на рисунке 2 видно, что размер фрагмента соответствует ожидаемому — 555 п. о. и присутствует в отобранных на селективной среде клоонах *E. coli*. Для более достоверного скрининга мы использовали разде-

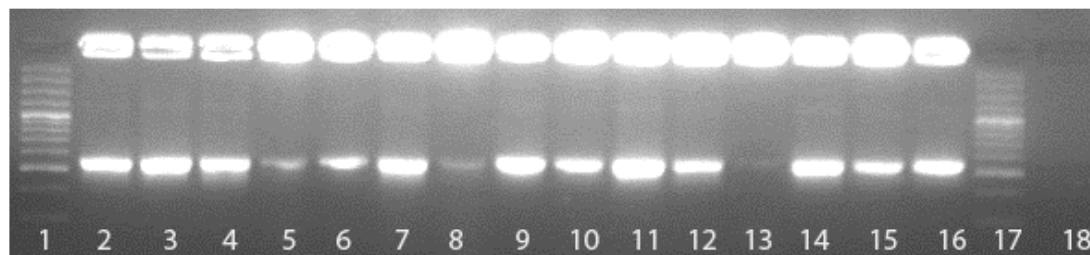


Рис. 2. Электрофореграмма ПЦР-продукта (555 п. н.) первичного скрининга колоний *E. coli*, выявленного посредством праймеров: U3Cas9-F, gRNA-R: 1, 17 — маркер молекулярного веса Gene Ruler 100bpPlus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific), 1–16 — анализируемые колонии *E. coli*, 18 — контроль

ление продуктов амплификации, полученных с помощью праймеров, фланкирующих часть U3 промотора, константную и варируемую части гидРНК размером 200 п. о., в 6% ПААГ, позволяющем разделять короткие фрагменты, различающиеся в 4 п. о. (рис. 3).

Анализ ПЦР продукта посредством ПААГ показал наличие ожидаемого фрагмента размером 200 п. о. в колониях *E. coli* после трансформации, что видно на электрофореграмме, представленной на рисунке 3.

Для стабильной интеграции CRISPR/Cas9 системы в геном *N. tabacum* нами были использованы агробактериальные штаммы *A. tumefaciens* EHA105, LBA4404. Методом трехродительского скрещивания бинарные векторы, несущие CRISPR/Cas9 систему, были введены в *A. tumefaciens* штаммы LBA4404, EHA105. Селекция агробактериальных колоний осуществлялась на среде, содержащей антибиотики канамицин (50 мг/л) и рифампицин (100 мг/л). Наличие векторной конструкции

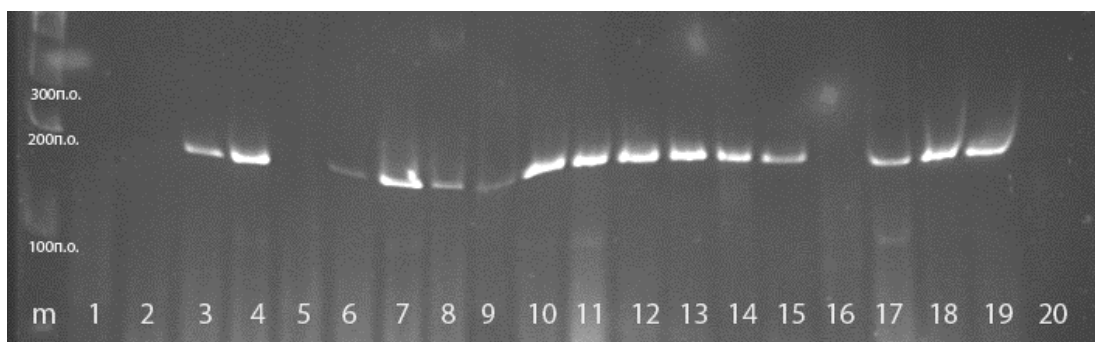


Рис. 3. Электрофореграмма ПААГ ПЦР-продукта размером 200 п. о. колоний *E. coli*, выявленного посредством праймеров: gRNA-F, gRNA-R: m — маркер молекулярного веса Gene Ruler 100bpPlus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific), 1–19 — анализируемые колонии *E. coli*, 20 — контроль

в *A. tumefaciens* было подтверждено методом ПЦР со специфичными праймерами к спейсеру и U3 промотору. Размер ПЦР фрагментов соответствует ожидаемому и составляет 406 п. н. (рис. 4). Амплификация проводилась для каждой сконструированной гидРНК со специфическими праймерами, представленными в таблице 1.

Для определения нуклеотидной последовательности и корректности сборки век-

торных конструкций был выбран метод секвенирования по Сэнгеру. Предварительно нами были амплифицированы продукты размером 555 п. о. и 406 п. н., полученных клонов *E. coli* и клонов *A. tumefaciens*, соответственно. Для амплификации данных фрагментов были использованы олигонуклеотиды, представленные в таблице 1. Анализ данных, полученных методом секвенирования по Сэнгеру с помощью программы SnapGene Viewer 6.0 и базы

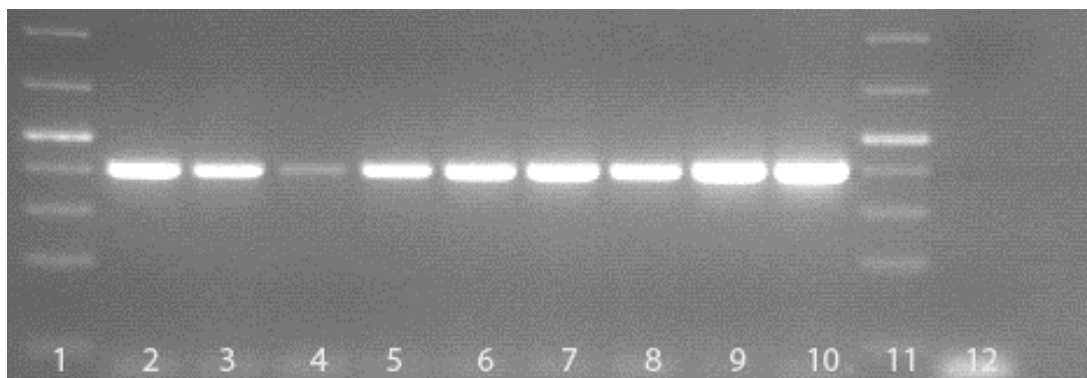


Рис. 4. Электрофореграмма ПЦР-продукта (406 п. н.), выявленного при амплификации клонов *A. tumefaciens* посредством праймеров: U3Cas9-F, gRNA5-R, несущих CRISPR/Cas9 систему: 1,11 — маркер молекулярного веса GeneRuler 1kp Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific), 2–10 — анализируемые колонии *A. tumefaciens*, 12 — контроль

данных NCBI, показал, что нуклеотидный состав продукта размером 555 п. о. соответствует U3 промотору, тракрРНК и крРНК, продукта 406 п. о. клонов *A. tumefaciens*, соответствует U3 промотору и гидовойРНК. Общий анализ полученных нуклеотидных последовательностей *E. coli* и *A. tumefaciens* показал корректность сборки CRISPR/Cas9 системы в бинарном векторе *pRGE31*.

Для доставки CRISPR/Cas9 системы в рас-

тительный геном и ее стабильной интеграции и экспрессии мы использовали метод *Agrobacterium*-опосредованной трансформации листовых дисков линии табака *Nicotiana tabacum* sv. *Petit Havana SR1*. При выборе эксплантов в культуре *in vitro* важно учитывать первоначальную дедифференциацию тканей исходного экспланта, поскольку от этого зависит дальнейший морфогенетический потенциал генотипа. Было показано, что использование

в качестве эксплантов листьев приводит к значительному образованию стеблевых почек на средах с цитокининами, а гиббереллины оказывают стимулирующее действие исключительно на экспланты листового происхождения [38, 39]. В наших исследованиях используя векторные конструкции для нокаута гена *NtPDS*: *pRGEB31 + gRNA5-pds*, *pRGEB31 + gRNAJp2-pds*, *pRGEB31 + gRNADeT186-pds*, посредством *A. tumefaciens* было трансформировано 752

экспланта. Процессы дедифференцировки листовой ткани и каллусогенеза в опытном варианте удалось инициировать с различной частотой (табл. 2).

Из данных, представленных в таблице 2, видно, что максимальная частота каллусогенеза наблюдалась при использовании векторной конструкции, содержащей гидРНК, комплементарной протоспейсеру 5 экзона, что может свидетельствовать о более высокой

Таблица 2

Инициация процессов каллусогенеза в листовых дисках табака, трансформированных конструкциями, несущими CRISPR/Cas9 систему

Конструкция	Количество эксплантов (шт.)	Количество каллусов (шт.)	Частота каллусогенеза (%)
<i>pRGEB31 + gRNA5-pds</i>	272	150	55,14
<i>pRGEB31 + gRNAJp2-pds</i>	240	98	40,83
<i>pRGEB31 + gRNA-DeT186-pds</i>	240	73	30,42
Контроль	250	241	96,40

эффективности и специфичности данной конструкции. Более высокая эффективность гидРНК комплементарной последовательности 5 экзона при нокауте гена мишени *NtPDS* также была показана в работах Gao J et al. [40].

Изменения в работе гена мишени *NtPDS* можно было визуализировать уже на этапе каллусогенеза: в опытном варианте у каллусов табака наблюдался фенотип химерного альбинизма, в отличие от контрольного

варианта (рис. 5).

Влияние изменений в гене *PDS* при использовании CRISPR/Cas9 на фенотип и высоту растения было показано также на таких культурах, как *Glycine max*, *Solanum tuberosum*, *Oryza sativa*, *Populus davidiana* × *P. bolleana*, *Cassava*, *Vitis vinifera*, *Cucumis melo* и банане [41–48].

Заключение

С помощью методов биоинформати-

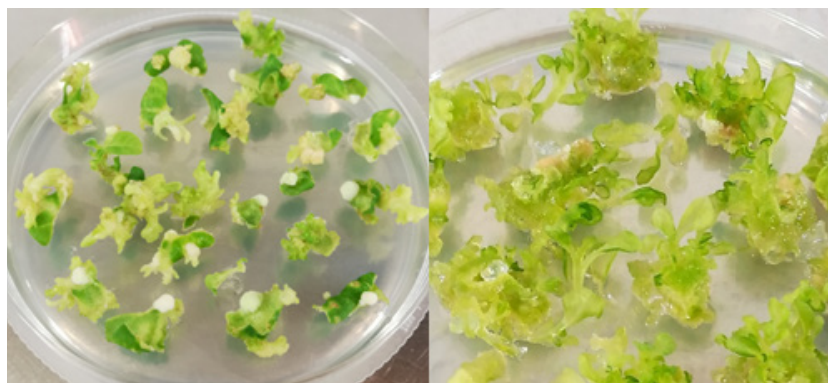


Рис. 5. Каллусогенез в культуре *in vitro* *N. tabacum*: А — опытный вариант при использовании векторной генетической конструкции *pRGEB31 + gRNAJp2-pds*, В — контрольный вариант

ческого анализа, молекулярно-генетического клонирования и базы данных NCBI были созданы 3 векторные конструкции: *pRGEB31 + gRNA5-pds*, *pRGEB31 + gRNAJp2-pds*, *pRGEB31 + gRNADeT186-pds*, несущие в своем составе гидРНК к различным кодирующим последовательностям гена *NtPDS N. tabacum*. Продукт данного гена (15-цис-фитоендесатураза) влияет на биосинтез хлорофилла у высших растений. Повреждение гена приводит к фенотипу альбиносов и карликовости. Созданные векторные конструкции несут в своем составе CRISPR/Cas9 систему *Streptococcus pyogenes*, состоящую из эндонуклеазы Cas9 под 35S промотором и одиночной направляющей (гидовой) РНК под OsU3 промотором. Используя различные биоинформатические платформы были выбраны для работы последовательности гидовых РНК с высокой специфичностью (с минимальными off-target эффектами и оптимальным содержанием GC пар — 40–55%) к выбранным протоспейсерным последовательностям гена-мишени *NtPDS* и с проксимально расположенной последовательностью PAM (5'-NGG-3'). Используя метод секвенирования по Сэнгеру была подтверждена корректность и правильность сборки созданных векторных конструкций. Методом *Agrobacterium*-опосредованной трансформации листовых дисков векторные конструкции были введены в геном *N. tabacum* sv. *Petit Havana SR1*. В результате трансформации был инициирован процесс каллусогенеза и получен морфогенный каллус, имеющий фенотип химерного альбиноса. Максимальная частота каллусогенеза наблюдалась при использовании конструкции *pRGEB31 + gRNA5-pds*. Таким образом, впервые в Республике Беларусь созданы эффективные векторные конструкции для редактирования генома с помощью системы CRISPR/Cas9. Методические подходы, разработанные в представленном исследовании, будут использованы в дальнейшем для редактирования геномов сельскохозяйственно-важных растений.

Список использованных источников

1. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems / L. Cong [et al.] / Science. – 2013. – Vol. 339, № 6121. – P. 819–823. doi.

org/10.1126/science.1231143.

2. Targeted genome engineering in human cells with the Cas9 RNA-guided endonuclease / SW. Cho [et al.] // Nat Biotechnol. – 2013. – Vol. 31, № 3. – P. 230–2. doi: 10.1038/nbt.2507.

3. Swartjes, T. Editor's cut: DNA cleavage by CRISPR RNA-guided nucleases Cas9 and Cas12a / T. Swartjes, R. Staals, J. van der Oost // Biochemical Society transactions. – 2020. – Vol. 48 (1). – P. 207–219. doi.org/10.1042/BST20190563.

4. Modern trends in plant genome editing: an inclusive review of the CRISPR/Cas9 toolbox / A. Razzaq [et al.] // International journal of molecular sciences. – 2019. – Vol. 20 (16). – 4 045 p. doi.org/10.3390/ijms20164045.

5. Samanta, MKCRISPR/Cas9: an advanced tool for editing plant genomes / MK. Samanta, A. Dey, S. Gayen // Transgenic Res. – 2016. – Vol. 25 (5). – P. 561–73. doi: 10.1007/s11248-016-9953-5.

6. Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA / H. Nishimasu [et al.] // Cell. – 2014. – Vol. 156 (5). – P. 935–49. doi: 10.1016/j.cell.2014.02.001.

7. Protospacer recognition motifs: mixed identities and functional diversity. RNA / SA. Shah [et al.] // Biol. – 2013. – Vol. 10 (5). – P. 891–9. doi: 10.4161/rna.23764.

8. Short motif sequences determine the targets of the prokaryotic CRISPR defence system / FJM. Mojica [et al.] // Microbiology (Reading). – 2009. – Vol. 155 (Pt 3). – P. 733–740. doi: 10.1099/mic.0.023960-0. PMID: 19246744.

9. Latest developed strategies to minimize the off-target effects in CRISPR-Cas-mediated genome editing / M. Naeem [et al.] // Cells. – 2020. – Vol. 9 (7). – P. 1 608. doi.org/10.3390/cells9071608.

10. Zhang, ZR. Effective use of sequence information to predict CRISPR-Cas9 off-target/ ZR. Zhang, ZR. Jiang // ComputStructBiotechnol J. – 2022. – Vol. 19 (20). – P. 650–661. doi: 10.1016/j.csbj.2022.01.006.

11. CRISPR-Cas9 induces large structural variants at on-target and off-target sites in vivo that segregate across generations / I. Höijer[et al.] // Nat Commun. – 2022. – Vol. 13 (1). – P. 627. doi: 10.1038/s41467-022-28244-5.

12. Whole-genome sequencing reveals rare off-target mutations in CRISPR/Cas9-edited

- grapevine / X. Wang [et al.] // Horticulture research. – 2021. – Vol. 8 (1). – 114 p. doi.org/10.1038/s41438-021-00549-4.
13. Strategies to increase on-target and reduce off-target effects of the CRISPR/Cas9 system in plants / Z. Hajiahmadi [et al.] // International journal of molecular sciences. – 2019. – Vol. 20(15). – P. 3 719. doi.org/10.3390/ijms20153719.
14. Achieving plant CRISPR targeting that limits off-target effects / JD. Wolt [et al.] // Plant Genome. – 2016. – Vol. 9 (3). – P. 1–8. doi: 10.3835/plantgenome2016.05.0047.
15. CRISPR-Cas9 editing in maize: systematic evaluation of off-target activity and its relevance in crop improvement / J. Young [et al.] // Scientific reports. – 2019. – Vol. 9 (1). – P. 6 729. doi.org/10.1038/s41598-019-43141-6.
16. Доставка CRISPR/Cas-компонентов в клетки высших растений для редактирования их геномов / Б. Р. Кулуев [и др.] // Физиология растений. – 2019. – Т. 66, № 5. – С. 339–353.
17. Van Eck, J. Applying gene editing to tailor precise genetic modifications in plants / J. Van Eck // The Journal of biological chemistry. – 2020. – Vol. 295, (38). – P. 13 267–13 276. doi.org/10.1074/jbc.REV120.010850.
18. Demonstration of CRISPR/Cas9/sgrRNA-mediated targeted gene modification in Arabidopsis, tobacco, sorghum and rice / W. Jiang [et al.] // Nucleic Acids Res. – 2013. – Vol. 41 (20). – P. e188. doi: 10.1093/nar/gkt780.
19. Cas9-Guide RNA Directed Genome Editing in Soybean / Z. Li [et al.] // Plant Physiol. – 2015. – Vol. 169 (2). – P. 960–70. doi: 10.1104/pp.15.00783.
20. The CRISPR/Cas9 system and its applications in crop genome editing / A. Bao [et al.] // Crit Rev Biotechnol. – 2019. – Vol. 39 (3). – P. 321–336. doi: 10.1080/07388551.2018.1554621.
21. P. Wang [et al.] // High efficient multisites genome editing in allotetraploid cotton (*Gossypium hirsutum*) using CRISPR/Cas9 system. Plant Biotechnol J. – 2018. – Vol. 16 (1). – P. 137–150. doi: 10.1111/pbi.12755.
22. Xie, K. RNA-guided genome editing in plants using a CRISPR-Cas system. / Xie K, Yang Y. // Mol Plant. – 2013. – Vol. 6 (6). – P. 1 975–83. doi: 10.1093/mp/sst119.
23. Periwai, V. A comprehensive overview of computational resources to aid in precision genome editing with engineered nucleases / Periwai, V. // Brief Bioinform. – 2017. – Vol. 18(4). – P. 698–711. doi: 10.1093/bib/bbw052.
24. Дизайн РНК-гидов для CRISPR/Cas редактирования геномов растений / Геращенко, Г. А. [и др.] // Молекулярная биология. – 2020. – Т. 54, № 1. – С. 29–50.
25. Molecular adaptation of photoprotection: triplet states in light-harvesting proteins / A. Gall [et al.] // Biophys J. – 2011. – Vol. 101 (4) – P. 934–42. doi: 10.1016/j.bpj.2011.05.057.
26. Mechanisms underlying carotenoid absorption in oxygenic photosynthetic proteins / M. M. Mendes-Pinto [et al.] // The Journal of biological chemistry. – 2013. – Vol. 288 (26). – P. 18 758–18 765. doi.org/10.1074/jbc.M112.423681.
27. Disruption of phytoene desaturase gene results in albino and dwarf phenotypes in Arabidopsis by impairing chlorophyll, carotenoid, and gibberellin biosynthesis / G. Qin [et al.] // Cell Res. – 2007. – Vol. 17. – P. 471–482. doi.org/10.1038/cr.2007.40.
28. Norris, S. R. Genetic dissection of carotenoid synthesis in arabidopsis defines plastoquinone as an essential component of phytoene desaturation / S. R. Norris, T. R. Barrette, D. DellaPenna // The Plant cell. – 1995. – Vol. 7 (12). – P. 2 139–2 149. doi.org/10.1105/tpc.7.12.2139.
29. CRISPR/Cas9-mediated efficient editing in phytoene desaturase (PDS) demonstrates precise manipulation in banana cv. Rasthali genome / N. Kaur [et al.] // Funct Integr Genomics. – 2018. – Vol. 18 (1). – P. 89–99. doi: 10.1007/s10142-017-0577-5.
30. Genome editing in PDS genes of tomatoes by non-selection method and of *Nicotiana benthamiana* by one single guide RNA to edit two orthologs / H. Komatsu [et al.] // Plant biotechnology. – 2020. – Vol. 37 (2). – P. 213–221. doi.org/10.5511/plantbiotechnology.20.0527b.
31. Efficient genome editing in apple using a CRISPR/Cas9 system / C. Nishitani [et al.] // Nat Sci Rep. – 2016. – Vol. 6. – 31 481 p. doi.org/10.1038/srep31481.
32. CRISPR/Cas9-mediated efficient and heritable targeted mutagenesis in tomato plants in the first and later generations / C. Pan [et al.] // Sci Rep. – 2016. – Vol. 6. – P. 247–265. doi.org/10.1038/srep24765.
33. Efficient CRISPR/Cas9-mediated targeted

- mutagenesis in *Populus* in the first generation / D. Fan [et al.] // *Sci Rep.* – 2015. – Vol. 5. – P. 12 217. doi.org/10.1038/srep12217.
34. CCTop: an intuitive, flexible and reliable CRISPR/Cas9 target prediction tool / M. Stemmer [et al.] // *PLOS ONE.* – 2015. – Vol. 10 (4). – P. e0124633. doi: 10.1371/journal.pone.0124633.
35. Refined sgRNA efficacy prediction improves large- and small-scale CRISPR–Cas9 applications / M. Labuhn [et al.] // *Nucleic Acids Research.* – 2017. – Vol. 46 (3). – P. 1 375–1 385. doi: 10.1093/nar/gkx1268.
36. Highly efficient RNA-guided genome editing in human cells via delivery of purified Cas9 ribonucleoproteins / S. Kim [et al.] // *Genome Res.* – 2014. – Vol. 24 (6). – P. 1 012–9. doi: 10.1101/gr.171322.113.
37. Comparison of various nuclear localization signal-fused Cas9 proteins and Cas9 mRNA for genome editing in zebrafish / P. Hu [et al.] // *G3 (Bethesda, Md.).* – 2018. – Vol. 8 (3). – P. 823–831. doi.org/10.1534/g3.117.300359.
38. Preece, J. E. Problems with explant exudation in micropropagation / J. E. Preece, M. E. Compton // *Biotechnology in Agriculture and Forestry.* – 1991. – Vol. 17. – P. 168–189. doi.org/10.1007/978-3-642-76415-8_10.
39. Meins, F. The Induction of cytokinin habituation in primary pith explants of tobacco / F. Meins, J. Lutz // *Planta.* – 1980. – Vol. 149 (4). – P. 402–407.
40. CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis in *Nicotiana tabacum* / J. Gao [et al.] // *Plant Mol Biol.* – 2015. – Vol. 87 (1–2). – P. 99–110. doi: 10.1007/s11103-014-0263-0.
41. Lu, QSMAn efficient and specific CRISPR–Cas9 genome editing system targeting soybean phytoene desaturase genes / QSM Lu, L. Tian // *BMC Biotechnol.* – 2022. – Vol. 22 (1). – P. 7. doi: 10.1186/s12896-022-00737-7.
42. CRISPR/Cas9-mediated efficient editing in phytoene desaturase (PDS) demonstrates precise manipulation in banana cv. Rasthali genome / N. Kaur [et al.] // *Funct Integr Genomics.* – 2018. – Vol. 18. – P. 89–99. doi.org/10.1007/s10142-017-0577-5.
43. Efficient targeted mutagenesis in potato by the CRISPR/Cas9 system / S. Wang [et al.] // *Plant Cell Rep.* – 2015. – Vol. 34. – P. 1 473–1 476. doi.org/10.1007/s00299-015-1816-7.
44. Comparison of CRISPR–Cas9/Cas12a ribonucleoprotein complexes for genome editing efficiency in the rice phytoenedesaturase (OsPDS) gene / R. Banaka r[et al.] // *Rice (N Y).* – 2020. – Vol. 13 (1). – P. 4. doi.org/10.1186/s12284-019-0365-z.
45. CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis in grape / I. Nakajima[et al.] // *PLOS ONE.* – 2017. – Vol. 12 (5). – P. e0177966. doi.org/10.1371/journal.pone.0177966.
46. Hooghvorst, I. Efficient knockout of phytoene desaturase gene using CRISPR/Cas9 in melon / I. Hooghvorst, C. López-Cristoffanini, S. Nogués, // *Scientific reports.* – 2019. – Vol. 9 (1). – 17 077 p. doi.org/10.1038/s41598-019-53710-4.
47. Efficient CRISPR/Cas9 genome editing of phytoene desaturase in Cassava / J. Odipio [et al.] // *Front Plant Sci.* – 2017. – Vol. 18 (8). – P. 1 780. doi: 10.3389/fpls.2017.01780.
48. Efficient CRISPR/Cas9-mediated gene editing in an interspecific hybrid poplar with a highly heterozygous genome/ J. Wang [et al.] // *Front. Plant Sci.* – 2020. – Vol. 7. – 703 p. doi.org/10.3389/fpls.2020.00996.

A. M. Shishlova-Sokolovskaya, E. P. Khmlevskaya, O. Yu. Urbanovich

DEVELOPMENT OF THE CRISPR/CAS9 SYSTEM FOR THE GENOME EDITING OF THE *NtPDS* GENE OF TOBACCO (*NICOTIANA TABACUM*)

State Scientific Institution

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

27 Akademicheskaya St., 220072 Minsk, Republic of Belarus

e-mail: s_anastasia78@mail.ru

The CRISPR/Cas9 system is one of the most powerful tools for the editing of plant genomes. In the presented study, the vector constructs developed on the basis of the CRISPR/Cas9 system were used to edit the *Nicotiana tabacum* genome. The *NtPDS* gene encoding the 15-cis-phytoene desaturase enzyme was chosen as the target. A knockout of this gene in plants results in the albinism phenotype and dwarfism. Using the *in silico* bioinformatics platforms, three vector constructs based on the binary pRGE31 vector were modeled: *pRGE31 + gRNA4-pds*, *pRGE31 + gRNAJp2-pds*, and *pRGE31 + gRNADeT186-pds*, carrying in its composition the CRISPR/Cas9 system with spacers to different parts of the structural domains of the *NtPDS* gene. Vector constructs were assembled using molecular cloning techniques. The accuracy and correctness of their assembly was confirmed by Sanger sequencing. By means of *Agrobacterium*-mediated transformation of leaf discs, the genetic constructs were introduced into the genome of the *N. tabacum* cv. *Petit Havana SR1* model object. During the cultivation of tobacco leaf discs, it was possible to initiate callusogenesis and morphogenesis processes using all three constructs, however, the maximum frequency of these processes was observed when using the *pRGE31 + gRNA4-pds* construct.

Keywords: system CRISPR/Cas9, g/sgRNA, PAM, *pRGE31*, *NtPDS*, *Nicotiana tabacum*.

Дата поступления в редакцию: 26 мая 2022 г.

А. Н. Верчук^{1,2}, С. В. Кубрак¹, А. В. Кильчевский¹

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ МЕТОДОВ ПРЕДОБРАБОТКИ ПЫЛЬЦЫ РАСТЕНИЙ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ КАЧЕСТВЕННЫХ ОБРАЗЦОВ ДНК

¹Государственное научное учреждение

«Институт генетики и цитологии НАН Беларуси»,

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

e-mail: a.n.verchuk@mail.ru

²Государственное учреждение

«Научно-практический центр Государственного комитета судебных экспертиз»

Республики Беларусь», 220114, г. Минск, ул. Филимонова 25

Дана оценка эффективности методов предобработки образцов пыльцы при получении препаратов ДНК, выделяемых из шести видов растений. Качество и концентрацию образцов ДНК оценивали с помощью спектрофотометрии, флуориметрии и ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ). Были выявлены несколько наиболее универсальных методов, позволяющих увеличить количество выделенной ДНК у всех исследуемых растений. Установлен положительный эффект от гомогенизации с металлическими шариками и последующей обработки ксилолом; гомогенизации с металлическими шариками и растирания с кварцевым песком; растирания с кварцевым песком и последующей обработки ксилолом.

Ключевые слова: ДНК пыльцы, выделение ДНК, предобработка пыльцы, ПЦР-РВ, палинология.

Введение

Использование молекулярно-генетических методов в прикладной палинологии, в том числе в судебной палинологии, дает возможность получить больше информации об образцах пыльцы как объекте экспертизы [1]. После отбора проб специалисту необходимо получить образец ДНК, подходящий для дальнейшего анализа, так как от качества выделенного препарата ДНК будет зависеть эффективность всех последующих этапов исследования. В случае использования пыльцы процесс осложняется ее микроколичеством и особенностями строения оболочки. Наружная оболочка пыльцевого зерна образована воскоподобным биополимером спорополленином, устойчивым как к воздействию кислот и щелочей, так и к нагреванию до 200 °С. По этой причине выделение ДНК из пыльцевых зерен — сложная задача, которая в полной мере до сих пор не решена.

Одним из способов повышения эффективности выделения ДНК из пыльцы может стать обработка пыльцевых зерен, предшествующая основной методике выделения и направленная

на разрушение внешней оболочки. Предобработка должна не только максимально увеличивать количество выделенной ДНК, но и не допускать значительной деградации нуклеиновых кислот, минимизировать риски контаминации, а также не допускать потери образца. Чаще всего исследуемый препарат пыльцы состоит из сложной смеси пыльцевых зерен разных растений, строение которых варьирует у разных видов. В связи с этим изучение влияния предобработки на пыльцу разных видов растений представляется необходимым этапом методики выделения ДНК из такого сложного объекта, как пыльцевой материал. Цель данной работы состояла в изучении влияния различных методов предобработки и их комбинаций на эффективность выделения ДНК из пыльцы разных видов растений.

Материалы и методы

В данном исследовании тестировали четыре способа предобработки и их сочетание: гомогенизация с металлическими шариками диаметром 3 мм при 30 ударах в сек в течение 3 мин (Ш); температурные перепады от –54 °С до

+80 °С в дистиллированной воде (Т); гомогенизация кварцевым песком в ступке пестиком (П) и воздействие ксилола при +80 °С в течение 30 мин с периодическим вортексированием (К) — всего 10 комбинированных методов, отображенных в таблице 1. Объектом исследо-

вания являлась пыльца шести видов растений: береза повислая (*Betula pendula*), сосна обыкновенная (*Pinus sylvestris*), ель обыкновенная (*Picea abies*), дуб черешчатый (*Quercus robur*), тюльпан гибридный (*Tulipa hybrida*) и кукуруза сахарная (*Zea mays*).

Таблица 1

Методы предобработки и их комбинации, протестированные в исследовании

	гомогенизация с металлическими шариками (Ш)	температурные перепады (Т)	растирание кварцевым песком (П)	обработка ксилолом при +80°С (К)
гомогенизация с металлическими шариками (Ш)	1 Ш	—	—	—
температурные перепады (Т)	2 Ш × Т	3 Т	—	—
растирание кварцевым песком (П)	4 Ш × П	5 Т × П	6 П	—
обработка ксилолом при +80 °С (К)	7 Ш × К	8 Т × К	9 П × К	10 К

Примечание. 1 — гомогенизация с металлическими шариками (Ш); 2 — совместное воздействие гомогенизации с металлическими шариками и температурных перепадов (Ш × Т); 3 — воздействие температурных перепадов (Т); 4 — совместное воздействие гомогенизации с металлическими шариками и растирания кварцевым песком (Ш × П); 5 — совместное воздействие температурных перепадов и растирание кварцевым песком (Т × П); 6 — растирание кварцевым песком (П); 7 — совместное воздействие гомогенизации с металлическими шариками и обработка ксилолом (Ш × К); 8 — совместное воздействие температурных перепадов и обработка ксилолом (Т × К); 9 — совместное воздействие растирания кварцевым песком и обработка ксилолом (П × К); 10 — обработка ксилолом (К)

Исследуемые виды представляют различные группы растений: древесные и травянистые формы, однодольные и двудольные, голосеменные и покрытосеменные. Выбранный видовой состав позволял учесть морфологические и химические особенности внешней оболочки разных типов пыльцы.

Отбирали приблизительно одинаковый объем пыльцы, при этом навески варьировали по массе от 2,69 до 9,28 мг в зависимости от вида. Повторности для каждого вида были предварительно выровнены и имели одинаковую массу (табл. 2). Измерения навесок проводились на аналитических весах Radwag AS/C/2/N 82/220 (Польша), дискретность которых составляет 0,01 мг.

Выделение ДНК осуществляли с помощью

набора GeneJet Plant Genomic DNA Purification Kit (TS KO792, Thermo Fisher Scientific, США), согласно инструкции производителя. Образцы ДНК исследовались с помощью спектрофотометра DS-11 (Denovix, США), флуориметра Quantus (Promega, США) и ПЦР-ПВ, которая проводилась на амплификаторе QuantStudio5 (Applied Biosystems, США).

ПЦР проводили при следующих условиях: 95 °С — 5 мин, 40 циклов: 95 °С — 15 сек, 60 °С — 60 сек. В качестве ПЦР смеси использовали мастер-микс ArtMix Low ДНК-полимераза (АртБиоТех, Беларусь) с интеркалирующим красителем EvaGreen PCR-379 (Jena Bioscience, Германия). Итоговая концентрация праймеров в смеси — 0,2 пмоль/мкл, общий объем ПЦР смеси составлял 20 мкл. Первич-

Таблица 2

Масса навесок пылевого материала в каждой исследуемой пробе в зависимости от вида растений

Вид образца	Масса навески пылицы (мг/образец)
береза повислая	9,28
сосна обыкновенная	9,09
ель обыкновенная	2,77
дуб черешчатый	2,69
тюльпан гибридный	4,89
кукуруза сахарная	8,22

ную оценку специфичности ПЦР проводили на этапе плавления ампликонов.

В ПЦР-РВ использовали две пары праймеров с различной чувствительностью: *18S* и *eEF1Art* [2, 3]. Праймеры *18S* синтезированы к участку рибосомальной *18S* рРНК, которая входит в состав малой субъединицы рибосом эукариот и является основным компонентом всех эукариотических клеток. Праймеры *18S* универсальны и имеют большое количество мест посадки, образуя множество копий на каждую клетку организма. Праймеры *eEF1Art* разработаны к гену эукариотического фактора элонгации, который представляет собой набор белков, функционирующих в рибосоме во время синтеза белка. Для праймеров *eEF1Art* существует меньше мест посадки, чем для *18S*, о чем свидетельствует широкая номенклатура факторов элонгации, поэтому с помощью *eEF1Art* синтезируется меньшее количество копий.

Результаты и обсуждение

Концентрации образцов ДНК, измеренные методом спектрофотометрии, находились в диапазоне от 4,45 до 11,20 нг/мкл в зависимости от способа предобработки. Значения концентраций, близкие к пороговым, имеют высокую погрешность, что отражается на точности измерения. То же самое касается показателей чистоты препарата, определяемых по отношению поглощения при 260/230 и 260/280 нм. Если концентрация ДНК составляет <20 нг/мкл, для таких образцов невозможно точное установление показателей 260/280 и 260/230 [4].

Абсолютные значения результатов флуори-

метрии были заметно ниже, чем спектрофотометрии, и составляли от 0,018 до 1,525 нг/мкл (табл. 3). Флуорофор связывается только с двухцепочечной ДНК, поэтому измерение концентрации на флуориметре более корректно, так как не учитываются сильно деградированные молекулы ДНК.

Наиболее высокие значения концентрации ДНК были получены при обработке пылицы тремя способами: гомогенизация с металлическими шариками и обработка ксилолом; гомогенизация с металлическими шариками и растирание кварцевым песком; растирание с кварцевым песком и обработка ксилолом (1,525 нг/мкл; 1,010 нг/мкл; 0,570 нг/мкл соответственно). Самый низкий результат получен при однокомпонентном воздействии температурных перепадов — 0,018 нг/мкл.

Измерение концентрации ДНК при помощи ПЦР-РВ позволяет оценить эффективную концентрацию ДНК, которая учитывает только те фрагменты ДНК, которые пригодны для ПЦР — неповрежденные цепи достаточной длины. Концентрация эффективной ДНК может отличаться от концентраций, измеренных спектро- и флуориметрически. С одной стороны, в ПЦР могут вступать и одноцепочечные фрагменты, с другой стороны, наличие примесей, особенно фенольной природы, оказывают ингибирующее действие на ПЦР [5]. Количество ДНК в образце оценивается по минимальному числу циклов амплификации исследуемого локуса, превышающему пороговое значение. Низкое значение порогового числа циклов (Ct) указывает на высокий уровень содержа-

Таблица 3

Показатели концентраций ДНК, измеренные на флуориметре, и *Ct* для маркеров *18S* и *eEF1Art* в зависимости от методов предобработок (средние значения для шести видов)

Метод предобработки	Концентрация ДНК, нг/мкл	<i>Ct 18S</i>	<i>Ct eEF1Art</i>
К	0,045	26,199 ± 3,211	34,675 ± 0,379
Ш	0,474	22,364 ± 2,095	34,272 ± 0,442
Ш × К	1,525	20,949 ± 3,111	34,489 ± 0,350
Ш × П	1,010	21,692 ± 3,375	33,252 ± 2,119
Ш × Т	0,218	22,423 ± 3,010	34,088 ± 1,069
П	0,414	23,083 ± 3,409	34,230 ± 1,002
П × К	0,570	22,427 ± 3,303	32,745 ± 2,804
П × Т	0,256	23,312 ± 3,778	34,270 ± 0,839
Т	0,018	27,578 ± 3,023	34,716 ± 0,386
Т × К	0,048	27,083 ± 3,169	34,976 ± 0,527

ния целевой ДНК в образце. Если значение *Ct* оказывается больше 30 циклов, возрастает вероятность неспецифической амплификации.

Определение количества ДНК методом ПЦР в реальном времени согласуется с результатами определения концентрации на флуориметре. При амплификации ДНК с маркером *18S* (табл. 3) более высокие результаты показали следующие методы: гомогенизация с металлическими шариками и обработка ксилолом; гомогенизация с металлическими шариками и растирание кварцевым песком; гомогенизация с металлическими шариками. Среднее пороговое число циклов для этих трех предобработок составляло 20,949 ± 3,111, 21,692 ± 3,375, 22,364 ± 2,095 соответственно, что свидетельствует о более высоком количестве ДНК в образцах, по сравнению со значением *Ct* для температурных обработок — 27,578 ± 3,023. Результаты предобработки, оцененные по амплификации с маркером *eEF1Art*, были сопоставимы с результатами, полученными по маркеру *18S*, но с более низким разбросом значений. Основные характеристики образцов ДНК, выделенных из пыльцы шести изучаемых видов растений, с учетом десяти вариантов предобработок, представлены в таблице 4.

Рассмотрение результатов измерения концентрации ДНК для каждого вида растений в отдельности показало, что для трех из ше-

сти видов (береза повислая, дуб черешчатый, ель обыкновенная) на количество выделенной ДНК наиболее положительно повлияла совместная гомогенизация металлических шариков и обработка ксилолом; для двух видов (сосна обыкновенная, кукуруза сахарная) — растирание кварцевым песком и гомогенизация металлическими шариками; для тюльпана гибридного наибольшее количество ДНК получено при растирании кварцевым песком с обработкой ксилолом. Однокомпонентное воздействие температуры и/или совместное воздействие с другими предобработками положительного влияния на выделение ДНК не оказывает. По-видимому, этот способ предобработки не приводит к разрушению внешней оболочки пыльцы. В отличие от показателей флуориметрии, образцы, обработанные температурными перепадами, имеют высокие значения концентрации ДНК при измерении на спектрофотометре. Подобную разницу можно объяснить тем, что температурные перепады могут способствовать дегградации ДНК, тем самым снижая количество двухцепочечных молекул, фиксируемых флуориметром.

Таким образом, различные варианты механического воздействия на оболочку пыльцы или сочетание механического и химического воздействия показывают наиболее эффективный результат. Температурное воздействие только в отдельных случаях приводило к уве-

Таблица 4

Основные характеристики образцов ДНК, выделенных из пыльцы шести видов растений

Параметры	К	Ш	Ш × К	Ш × П	Ш × Т	П	П × К	П × Т	Т	Т × К
Береза повислая										
Конц-ция ДНК, нг/мкл (спектрофотометр)	7,379	5,988	9,672	5,843	6,842	3,764	8,103	4,103	11,733	6,176
Конц-ция ДНК, нг/мкл (флуориметр)	0,002	0,058	1,905	1,095	0,266	0,408	0,251	0,269	0,032	0,010
Ct 18S	22,83	21,16	15,86	16,43	17,31	17,65	18,48	17,28	24,74	24,31
Ct eEF1Art	34,65	34,73	34,74	34,53	32,17	34,36	34,44	35,58	34,94	35,12
Ель обыкновенная										
Конц-ция ДНК, нг/мкл (спектрофотометр)	7,386	4,627	9,933	4,583	6,675	4,672	8,052	4,472	6,396	6,198
Конц-ция ДНК, нг/мкл (флуориметр)	0,018	1,215	2,040	0,375	0,331	0,257	1,415	0,147	0,003	0,015
Ct 18S	30,18	24,39	23,71	26,03	25,61	26,66	23,98	27,15	31,57	30,21
Ct eEF1Art	34,65	34,11	34,25	34,55	34,10	33,94	32,50	33,61	34,05	33,85
Сосна обыкновенная										
Конц-ция ДНК, нг/мкл (спектрофотометр)	7,238	4,670	14,793	12,312	5,783	6,451	6,610	10,940	15,609	6,299
Конц-ция ДНК, нг/мкл (флуориметр)	0,068	0,690	4,250	4,100	0,402	1,605	0,252	0,760	0,018	0,005
Ct 18S	29,52	25,26	24,05	23,39	24,43	25,25	27,07	26,04	30,83	30,34
Ct eEF1Art	35,04	34,77	34,61	34,61	35,10	34,58	33,29	33,92	35,20	35,01
Дуб черешчатый										
Конц-ция ДНК, нг/мкл (спектрофотометр)	5,174	3,766	4,105	4,013	7,887	3,921	3,812	3,477	7,423	1,175
Конц-ция ДНК, нг/мкл (флуориметр)	0,038	0,073	0,057	0,005	0,008	0,045	0,01	0,001	0,003	0,001
Ct 18S	24,55	21,92	21,24	23,63	23,94	25,68	25,47	27,18	28,79	27,83
Ct eEF1Art	34,30	34,03	34,73	34,65	35,10	35,27	35,06	35,26	34,91	35,22
Тюльпан гибридный										
Конц-ция ДНК, нг/мкл (спектрофотометр)	7,144	6,656	6,657	6,980	6,416	6,400	33,387	3,996	7,256	9,214
Конц-ция ДНК, нг/мкл (флуориметр)	0,132	0,760	0,875	0,368	0,277	0,074	1,410	0,327	0,003	0,243
Ct 18S	23,06	19,61	18,90	20,11	20,79	21,47	18,62	20,03	23,56	21,57
Ct eEF1Art	35,18	34,36	34,73	29,86	34,06	32,40	34,41	33,88	34,39	35,52

Окончание таблицы 4

Параметры	К	Ш	Ш × К	Ш × П	Ш × Т	П	П × К	П × Т	Т	Т × К
Кукуруза сахарная										
Конц-ция ДНК, нг/мкл (спектрофотометр)	5,260	0,967	6,446	4,208	2,623	1,742	7,246	2,697	3,968	10,749
Конц-ция ДНК, нг/мкл (флуориметр)	0,011	0,048	0,020	0,118	0,023	0,097	0,084	0,033	0,051	0,017
Ct <i>18S</i>	27,06	21,85	21,93	20,57	22,46	21,78	20,94	22,19	25,98	28,23
Ct <i>eEF1Art</i>	34,23	33,62	33,89	31,31	34,00	34,83	26,76	33,37	34,81	35,14

личению выхода ДНК, но только в сочетании с механическим повреждением.

Поскольку эффективность ПЦР варьирует в зависимости от праймеров и матрицы, эффективность комбинации праймер-матрица оценивается в эксперименте по титрованию с последовательными разведениями ДНК-матрицы для создания стандартной кривой изменения Ct при каждом разведении. Для каждого из шести исследуемых видов были отобраны по 2–3 варианта предобработок, отобранных исходя из проанализированных ранее данных. Всего было взято 17 образцов для определения их эффективной концентрации по трем этапам последовательных разведений ДНК (1/3, 1/9, 1/27). При амплификации с прайме-

рами *eEF1Art* продукты амплификации получались во всех случаях только в образцах без разведения. Дальнейшее разведение (1/3, 1/9) приводило к снижению эффективности амплификации, а целевой ампликон наблюдали в 47% и 11,8% случаев соответственно, а при разведении в 1/27 специфической амплификации не наблюдалось вовсе, что подтверждает низкие, но рабочие концентрации ДНК в исследуемых образцах без разведения. С праймерами *18S* во всех исследуемых образцах при всех разведениях были получены специфические продукты амплификации (табл. 5). Таким образом, в случае использования праймера *18S*, рабочими концентрациями оказались даже самые небольшие количества ДНК (разве-

Таблица 5

Изменения значения Ct в зависимости от серии разведений образцов ДНК при использовании праймеров *18S*

Вид растения	Обработка	Ct <i>18S</i> 1C	Ct <i>18S</i> 1/3C	Ct <i>18S</i> 1/9C	Ct <i>18S</i> 1/27C
Береза повислая	Ш × П	12,32	13,80	15,37	17,18
	П × К	13,93	15,67	18,23	18,68
Дуб черешчатый	Ш	18,37	19,55	21,52	22,92
	Ш × П	20,21	21,49	22,96	24,89
	Ш × К	17,79	19,52	20,83	21,85
Сосна обыкновенная	П × Т	23,61	23,89	25,51	26,77
	П	22,92	23,51	24,95	26,01
	Т × К	27,23	27,80	27,84	29,44
Ель обыкновенная	Ш	21,53	23,60	24,91	26,86
	П	23,71	24,99	26,25	27,26
	П × К	21,54	23,21	24,65	25,82

Окончание таблицы 5

Вид растения	Обработка	Ct 18S 1C	Ct 18S 1/3C	Ct 18S 1/9C	Ct 18S 1/27C
Тюльпан гибридный	Ш	15,51	17,64	19,66	20,71
	Ш × К	15,38	16,70	18,52	23,43
	П × К	15,51	15,06	17,95	19,78
Кукуруза сахарная	Ш × П	16,19	17,51	19,46	20,95
	П	18,28	19,97	21,50	23,21
	П × К	16,90	18,44	19,81	21,58

дение 1/27), полученные из микроколичеств пыльцевого материала.

Метод количественного определения ДНК с помощью ПЦР-РВ основан на построении графика зависимости флуоресценции от числа циклов в логарифмической шкале [6]. По графикам линейной регрессии, построенным на основании зависимости порогового значения Ct от разведений образцов ДНК, определены уравнения прямой значения R^2 и количество ДНК для Ct 30 (табл. 6).

Среди исследуемых образцов минимальные

концентрации ДНК, которые должны быть для Ct = 30, отмечены у березы повислой, дуба черешчатого и кукурузы сахарной. Остальные образцы также имели небольшие эффективные концентрации ДНК, способные амплифицировать целевой продукт. Несмотря на низкие концентрации, все образцы пригодны для ПЦР, а риск получения неспецифического продукта минимален. По значению коэффициента детерминации (R^2) можно судить о достоверности полученных результатов. В нашем исследовании все разведения и все образцы имели

Таблица 6

Уравнения прямой значения R^2 и количество ДНК для Ct 30 по серии разведений образцов ДНК с праймером 18S

Вид растения	Обработка	Значение R^2	Уравнение прямой	Количество ДНК нг/мкл для Ct 30
Береза повислая	Ш × П	0,9977	$y = -3,3825x + 12,379$	0,0055
	П × К	0,9434	$y = -3,5231x + 11,989$	0,0060
Сосна обыкновенная	П × Т	0,9425	$y = -2,3258x + 23,003$	0,0494
	П	0,9771	$y = -2,2445x + 23,202$	0,0484
	Т × К	0,8218	$y = -1,4015x + 23,792$	0,0119
Ель обыкновенная	Ш	0,9933	$y = -3,6286x + 21,936$	0,1084
	П	0,9971	$y = -2,5002x + 22,289$	0,0458
	П × К	0,9939	$y = -2,9905x + 16,202$	0,0099
Дуб черешчатый	Ш	0,9917	$y = -3,2751x + 14,524$	0,0089
	Ш × П	0,9908	$y = -3,2545x + 12,42$	0,0045
	Ш × К	0,9862	$y = -2,8284x + 14,458$	0,0088
Тюльпан гибридный	Ш	0,9788	$y = -3,6948x + 15,295$	0,0187
	Ш × К	0,9046	$y = -5,4376x + 14,301$	0,0557
	П × К	0,8451	$y = -3,2886x + 15,213$	0,0111

Окончание таблицы 6

Вид растения	Обработка	Значение R ²	Уравнение прямой	Количество ДНК нг/мкл для Ct 30
Кукуруза сахарная	Ш × П	0,9950	$y = -3,4040x + 12,924$	0,0066
	П	0,9996	$y = -3,4204x + 14,826$	0,0107
	П × К	0,9975	$y = -3,2315x + 13,387$	0,0059

значения R², близкие к 1, что свидетельствует о достоверности полученных данных.

Заключение

При тестировании физических и химического методов воздействия на пыльцу шести видов растений выявлены наиболее оптимальные способы предобработки: гомогенизация с металлическими шариками и последующая обработка ксилолом; гомогенизация с металлическими шариками и растирание кварцевым песком; растирание с кварцевым песком и последующая обработка ксилолом. Показано, что механическое воздействие на пыльцу совместно с обработкой ксилолом положительно влияет на результат выделения ДНК, вероятно, из-за повреждения наружной оболочки пыльцы. Вместе с тем растирание с кварцевым песком увеличивает риск контаминации и может привести к потере части образца. Гомогенизация с металлическими шариками помогает минимизировать данные риски и значительно снизить временные затраты на подготовку образцов. При использовании ксилола необходимо полностью удалять его из препарата ДНК, чтобы избежать ингибирования ПЦР. Перепады температуры не оказали положительного влияния для выделения ДНК из образцов пыльцы.

При определении концентрации ДНК методом спектрофотометрии, необходимо учитывать, что низкое содержание ДНК в образце приводит к высокой погрешности в точности измерений как концентрации, так и чистоты образца. Данные, полученные с помощью флуориметра, более достоверны при измерении образцов с низкой концентрацией ДНК. Результаты определения количества ДНК с помощью ПЦР-РВ позволяют учесть, как наличие примесей, оказывающих ингибирующее действие на ПЦР, так и получить информацию о минимальных эффективных концентрациях,

что важно при работе с микроколичествами биологического материала.

Работа выполнена при финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований, грант № Б22М-068.

Список использованных источников

- Верчук, А. Н. Направления современной палинологии и перспективы использования баркодирования ДНК для дифференциации растений по пыльце / А. Н. Верчук, С. В. Кубрак, А. В. Кильчевский // 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, 2021. – Т. 31. – С. 134–146. – ISSN 1999-9127.
- Suppression of the AvrBs1-specific hypersensitive response by the YopJ effector homolog AvrBsT from Xanthomonas depends on a SNF1-related kinase / R. Szczesny [et al.] // New Phytol. – 2010. – Vol. 187, № 4. – P. 1 058–1 074. – doi: 10.1111/j.1469-8137.2010.03346.x.
- ANT1 alleles and flavonoid accumulation in tomato / G. Schreiber [et al.] // Theor. Appl. Genet. – 2012. – Vol. 124, № 2. – P. 295–307.
- Koetsier, G. A practical guide to analyzing nucleic acid concentration and purity with microvolume spectrophotometers / G. Koetsier, E. Cantor // New England Biolabs Technical Note. – 2019. – Vol. 7. – P. 1–8.
- Балановский, О. П. Методы измерения концентрации ДНК: совпадение относительных величин и различия абсолютных / О. П. Балановский, Ж. А. Кагазежева, М. В. Олькова // ВЕСТНИК РГМУ. – 2019, № 3. – С. 27–33.
- Carr, A. C. Robust quantification of polymerase chain reactions using global fitting / A. C. Carr, S.D. Moore // PLoS ONE. – 2012. – Vol. 7, № 5. – P. e37640.

A. N. Viarchuk^{1,2}, S. V. Kubrak¹, A. V. Kilchevskiy¹

COMPARATIVE STUDY OF POLLEN PRETREATMENT METHODS TO OBTAIN QUALITATIVE DNA SAMPLES

¹State Scientific Institution

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

27 Akademicheskaya St., 220072 Minsk, Republic of Belarus

e-mail: a.n.verchuk@mail.ru

²State Institution

“Scientific and Practical Center of the State Forensic Examination Committee of the Republic of Belarus”

25 Filimonov St., 220114 Minsk, Republic of Belarus

The effectiveness of pretreatment methods in obtaining of DNA preparations isolated from the pollen of six plant species was evaluated. The quality and concentration of DNA samples were assessed using spectrophotometry, fluorimetry and real-time PCR. Several of the most universal methods that allow increasing the DNA yield in all the studied plants have been identified. A positive effect of homogenization with metal balls and subsequent treatment with xylene has been established; homogenization with metal balls and rubbing with quartz sand; rubbing with quartz sand and subsequent treatment with xylene.

Keywords: pollen DNA, DNA extraction, pollen pretreatment, real-time PCR, palynology.

Дата поступления в редакцию: 12 сентября 2022 г.

А. М. Нестюк¹, С. В. Пантелеев², В. А. Ярмолович¹, О. Ю. Баранов^{1,3}

ИЗУЧЕНИЕ ПОЛИМОРФИЗМА STS-МАРКЕРОВ ИЗОЛЯТОВ КОРНЕВОЙ ГУБКИ, ИНФИЦИРУЮЩИХ ЕЛЬ ЕВРОПЕЙСКУЮ (*PICEA ABIES* (L.) H.KARST.) В БЕЛАРУСИ

¹Белорусский государственный технологический университет
Республика Беларусь, 220006, г. Минск, ул. Свердлова, 13а
e-mail: antonina.nestyuk95@gmail.com

²Институт леса НАН Беларуси

Республика Беларусь, 246050, г. Гомель, ул. Пролетарская, 71

³Отделение биологических наук НАН Беларуси
Республика Беларусь, 220072, г. Минск, пр. Независимости, 66

В статье приведены результаты изучения генетического полиморфизма изолятов корневой губки, инфицирующих ель европейскую (*Picea abies*) в различных регионах Беларуси. На основании полученных данных осуществлена сравнительная оценка пригодности STS-маркеров для видовой диагностики изолятов корневой губки (*Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref. *sensu stricto* (s. s.) и *Heterobasidion parviporum* Niemelä & Korhonen). Экспериментальный материал в виде плодовых тел корневой губки и высечек инфицированной данным фитопатогеном древесины был отобран в насаждениях ели европейской на территории трех геоботанических подзон в семи Государственных лесохозяйственных учреждениях Министерства лесного хозяйства Республики Беларусь, а также на территории Негорельского учебно-опытного лесхоза и Национального парка «Беловежская пуща». На основании проведенного комплексного анализа образцов рекомендованы маркеры для проведения видовой молекулярно-генетической диагностики *H. annosum* и *H. parviporum*.

Ключевые слова: корневая губка, *Heterobasidion parviporum* Niemelä & Korhonen, *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref., видовая идентификация, молекулярно-генетический анализ, STS-маркеры.

Введение

Грибы рода *Heterobasidion* spp. являются наиболее распространенными возбудителями корневой гнили у хвойных пород деревьев северного, умеренного и бореального поясов. Впервые возбудитель корневой гнили хвойных древесных пород был описан еще в 1821 году Е. Fries как *Polyporus annosus* Fr. [1]. С 1930-х гг. некоторые ученые начали поиск географических рас гриба на основе их приуроченности к древесным видам. Однако, несмотря на выявленные различия в биохимических свойствах и патогенности, долгое время отдельные расы выделить не удавалось [2, 3]. Различные группы данного фитопатогена были выделены учеными только в конце XX века из комплекса видов Северного полушария *Heterobasidion annosum sensu lato* после проведения опытов по взаимной оплодотворяемости. В результате были выделены три европейские группы (Р, S и F) на территории Евразии и две (Р и S) — на

территории Северной Америки [1, 4, 5].

Несмотря на явную дифференциацию различных групп *Heterobasidion* относительно их взаимной оплодотворяемости, они не являются абсолютно интерстерильными. Гомокариотические чистые культуры из разных групп способны спариваться друг с другом с различной частотой. В Европе совместимость между группами S и F составляет 25–75%, в зависимости от происхождения изолятов S. Совместимость между группами Р и S составляет около 10%, также низкие показатели между группами Р и F. Совместимость североамериканских групп S и Р составляет примерно 18%. Совместимость между европейской и североамериканской Р группами довольно высокая, однако не абсолютная, а североамериканская S-группа демонстрирует высокую совместимость как с европейскими S, так и с F группами [1].

В настоящее время все данные группы

приобрели статус видов и описаны как *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref. *sensu stricto* (s. s.) (европейская Р-группа), *Heterobasidion parviporum* Niemelä & Korhonen (европейская S-группа), *Heterobasidion abietinum* Niemelä & Korhonen (европейская F-группа), *Heterobasidion irregulare* (Underw.) Garbel. & Otrosina (североамериканская Р-группа) и *Heterobasidion occidentale* Otrosina & Garbel. (североамериканская S-группа) [1, 5]. Так же за последнее десятилетие выявлено 11 видов грибов в составе азиатского комплекса *Heterobasidion*, однако, в отличие от европейской и североамериканской групп, данные виды являются облигатными сапротрофами [6].

На территории Беларуси, согласно литературным данным, встречаются два вида гриба из рода *Heterobasidion*: *H. annosum* и *H. parviporum*. Характер развития данных фитопатогенных видов грибов на разных древесных породах неодинаков. *H. annosum* является наиболее агрессивным видом, способным поражать широкий спектр древесных пород: сосну обыкновенную, ель европейскую, березу повислую, березу пушистую, осину и др. *H. annosum* поражает не только корни растущих деревьев, но и способен формировать гнили древесины в нижней (на высоте до 0,3 м) части ствола. В то же время *H. parviporum* развивается только на ели и неспособен поражать другие древесные породы. Гниль, вызываемая патогеном, из корней может заходить в ствол и распространяться в нем на высоту до 8–12 м.

Важной особенностью повреждения корневой губкой еловых насаждений является скрытый характер очагов, в результате чего своевременное обнаружение данного патогена представляется затруднительным, что, в свою очередь, способствует повреждению ельников на значительных территориях [7, 8].

Два вида (*H. annosum* и *H. parviporum*) гриба распространяются как при помощи базидиоспор (первичное заражение) [9], так и через корневые контакты в результате разрастания мицелия (вторичное заражение) [10], вследствие чего повреждаются обширные территории хвойных насаждений. На тех площадях, где заражение фитопатогенными грибами из рода *Heterobasidion* установлено, может произойти заражение молодых насаждений от инфицированных корней и пней предыдущее-

го поколения деревьев при помощи корневых контактов [1, 11, 12]. Данный вид распространения корневой гнили можно избежать, используя древесную породу, являющуюся невосприимчивой для заражения определенным видом гриба корневой губки.

Таким образом, установление в очагах усыхания видовой принадлежности патогена позволяет подобрать породный состав, в наибольшей степени подходящий для проведения лесовосстановления на вырубках.

К настоящему времени видовая идентификация корневой губки основана на морфологическом анализе плодовых тел и проведении теста соматической совместимости моноспоровых культур *in vitro*. Несмотря на присутствие некоторых морфологических различий (длина волосков на верхней стороне шляпки рядом с краем плодового тела, размер пор гименофора) плодовых тел между *H. parviporum* и *H. annosum* s.s., перекрывающиеся вариации затрудняют их достоверную идентификацию и наиболее точный метод определения видовой принадлежности, на наш взгляд, возможен лишь с применением молекулярно-генетических подходов. В то же время разрабатываются и другие направления анализа данных фитопатогенов: оценка белковых спектров [13], изоферментный анализ [14], профилирование жирных кислот и стеринов (FAST) [15]. Используемые ДНК-методы также разнообразны по их методологии: произвольно амплифицированная полиморфная ДНК (RAPD) [16, 17], маркеры на основе секвенирования рибосомной ДНК [18], произвольно амплифицированные мини- [19] и микросателлитные маркеры (RAMS) [20]. Для некоторых видов были предложены видоспецифичные праймеры для определения видовой принадлежности патогена как в условиях чистой культуры, так и непосредственно в древесине [21, 22]. В то же время следует отметить, что эффективность диагностики с использованием данных праймеров зачастую являлась низкой и в значительной степени была обусловлена региональной приуроченностью изолятов, использованных в данных исследованиях.

В связи с вышеизложенным, задачами данного исследования являются: разработка STS-маркеров корневой губки, изучение генетического полиморфизма среди изолятов, ин-

фицирующих ель европейскую, и на основе полученных данных проведение сравнительной оценки пригодности маркеров для диагностики *H. parviporum* и *H. annosum*.

Материалы и методы

Экспериментальный материал (плодовые тела и высечки инфицированной древесины) корневой губки был собран в еловых насаждениях семи Государственных лесохозяйственных учреждений Министерства лесного хозяйства Республики Беларусь, а также на территории Негорельского учебно-опытного лесхоза и Национального парка «Беловежская пуща». Получение препаратов суммарной ДНК из плодовых тел осуществлялось напрямую, а для высечек древесины — напрямую или через получение чистых культур патогена [23]. Предварительная верификация культур *in vitro* корневой губки осуществлялась с использованием праймеров HetF и HetR [24].

В качестве исходного материала для разработки локус-специфичных праймеров были использованы геномные (база данных WGS) последовательности *Heterobasidion* spp., представленные в NCBI GenBank: *H. annosum* (учетная запись проекта CVKZ01.1) и *H. parviporum* (учетная запись проекта PDUQ01.1). Предварительное выравнивание нуклеотидных последовательностей было произведено по следующему алгоритму: 1) ассемблированные последовательности (контиги) *H. parviporum* с помощью программного обеспечения CLC Sequence Viewer 6 были объединены в один искусственный скаффолд размером 33 193 158 н. о.; 2) с использованием онлайн ресурса SMS (Sequence Manipulation Suite) данный скаффолд был раз-

делен на 251 720 перекрывающихся (величина перекрытия — 50 н. о.) коротких фрагментов размером 250 н. о.; 3) полученные короткие фрагменты *H. parviporum* в программе Ugene v.42 были картированы на скаффолды (14 ед.) *H. annosum*, депонированные в NCBI GenBank. Далее с использованием программного обеспечения Ugene v.42 были идентифицированы участки генома, характеризующиеся сходством или отличиями между *H. annosum* и *H. parviporum*.

В качестве STS-маркеров были выбраны участки ортологичных генов *H. annosum* и *H. parviporum*. При этом последовательности места отжига праймеров для маркеров HetAll2, HetAllV3 и HetAllV4 выбирались с учетом возможности их ПЦР-амплификации у обоих видов. Основной характер изменчивости в данном случае был связан как с размером амплифицируемого продукта, так и с полиморфизмом нуклеотидной структуры фланкируемого региона для разных видов. Дизайн праймеров для ПЦР-амплификации STS-маркеров HetParv1, HetParV2, HetAnn3, HetAnV2 осуществлялся посредством выявления последовательностей, содержащих олигонуклеотидные делеции / инсерции у одного из видов, что обуславливало их применимость только по отношению к *H. parviporum* (HetParv1 и HetParV2) или *H. annosum* (HetAnn3 и HetAnV2). Перечень разработанных STS-маркеров приведен в таблице 1.

ПЦР-амплификация выполнялась с применением DreamTaq™ Green PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, США) согласно инструкции фирмы-производителя. Электрофоретическое фракционирование ампликонов выполнялось в 2% агарозном геле с целью эффективного их разделения и типировки.

Таблица 1

Перечень разработанных STS-маркеров

Маркер	Нуклеотидная структура праймеров для ПЦР-амплификации	Ожидаемый размер ампликона, н. о	Локализация
HetParv1	GGCCTCATTTGACCACTGACA TTTACCTGTGCGGCATCCTT	<i>H. parviporum</i> — 117 <i>H. annosum</i> — н/а*	Ген транскрипционного фактора семейства Swi5
HetAll2	GGWTCCTCCTCCACCAGACT CTAAYCCGTACATGGTGCGT	<i>H. parviporum</i> — 174 <i>H. annosum</i> — 173	Ген цистеиновой протеиназы (убиквитинилгидролазы) семейства C19
HetAnn3	CAGCCCCGATACGCAGAC AGCATCGTCTTCACGTTCTTC	<i>H. parviporum</i> — н/а <i>H. annosum</i> — 120	Ген ядерного белка семейства YL1

Окончание таблицы 1

Маркер	Нуклеотидная структура праймеров для ПЦР-амплификации	Ожидаемый размер ампликона, н. о	Локализация
HetAnV2	CGAGAGAGGGGACGGAGAT GCACGCCTGCAGTGGC	<i>H. parviporum</i> — н/а <i>H. annosum</i> — 100	Ген убиквитин связывающего фермента семейства UBCс
HetParV2	GCGAGAGAGGGGAGATG CTCCGTCAACCAGCAGT	<i>H. parviporum</i> — 106 <i>H. annosum</i> — н/а	Ген убиквитин связывающего фермента семейства UBCс
HetAllV3	TGTCCTTGACAAGTAGACAC CCCCCAAGTCAAGTACAAAA	<i>H. annosum</i> — 116 <i>H. parviporum</i> — 102	Ген глутаминсинтетазы
HetAllV4	GTGCCAAGTAAGAGGTTT TTTTGAGGACGACGATACTT	<i>H. annosum</i> — 161 <i>H. parviporum</i> — 149	ОПС (ORF) с неустановленной функцией

Примечание. н/а — продукт амплификации отсутствует для *H. annosum* (NCBI CVKZ01.1) или *H. parviporum* (NCBI PDUQ01.1)

Результаты и обсуждения

В ходе молекулярно-генетической оценки изолятов был выявлен широкий спектр генетического полиморфизма, связанный с варьированием размера амплифицируемых STS-маркеров корневой губки.

Маркер *HetAll2*

Несмотря на предполагаемое относительное сходство (173 и 174 н. о.) расчетных (на основании геномных данных) размеров ампликонов среди *Heterobasidion* spp., проведенный анализ ПЦР-профилей изученных образцов показал, что они характеризовались пятью электрофоретическими вариантами, детектируемых в условиях агарозного геля. При этом выявляемые алломорфы могли формировать различные типы электрофоретических профилей среди образцов корневой губки. Электрофоретические профили образцов (дикариотический мицелий) корневой губки были представлены однофракционными спектрами, что, как правило, соответствует гомозиготным генотипам (реже — гетерозиготным); двухфракционными — относящимися к гетерозиготным генотипам; трехфракционными — имеющих дополнительные наследственные аспекты (дубликации, паралогичные локусы, химерную структуру мицелия и др.). Секвенирование альтернативных электрофоретических вариантов показало их аллельную природу — выявляемые различия связаны с делецией / инсерцией фрагментов гомологичных последовательностей (данные не приведены).

Маркеры *HetParV1* и *HetAnn3*

Изменчивость среди образцов по маркерам

HetParV1 и *HetAnn3* в основном была связана с нуклеотидной структурой мест отжига праймеров и, как следствие, возможностью получения ПЦР-продуктов. При этом размер зон амплификации совпадал с расчетным. Интенсивность окраски электрофоретических фракций среди образцов варьировала в широкой степени, что могло быть связано как с нуклеотидной изменчивостью в местах отжига праймеров, так и с различиями в концентрации исходной матрицы в препаратах нуклеиновых кислот. Особую важность данный аспект имел для образцов, полученных из древесных кернов, содержащих также суммарную ДНК и растения-хозяина и различающихся по степени зараженности корневой губкой. Для нивелирования различий в концентрациях матриц была проведена предварительная нормализация образцов по данным количественной ПЦР (универсальные праймеры HetF и HetR, протокол SYBRGreen). Однако использованный STS-маркер Het представляет собой локус, входящий в состав рДНК, копияность которой, по литературным данным, может варьировать в определенной степени среди штаммов и видов грибных организмов.

Маркеры *HetAnV2* и *HetParV2*

Выявляемый полиморфизм среди образцов корневой губки по маркеру *HetParV2* был связан с существенными отличиями нуклеотидных последовательностей в зоне отжига праймеров, что обуславливало наличие или отсутствие ПЦР-продукта. В то же время, для маркера *HetAnV2*, различия между образцами были аналогичны *HetParV2*, но также выявлялись и амплифицируемые варианты иного (от

расчетного) размера.

Маркер *HetAllV3* и *HetAllV4*

Проведенный анализ образцов корневой губки по маркерам *HetAllV3* и *HetAllV4* показал наличие продуктов амплификации для всех изученных изолятов (рис. 1). Выявляемый полиморфизм был связан с изменением размеров локусов и соответствовал расчетным значениям, полученным на основании анализа геномных данных *H. annosum* (учетная запись проекта CVKZ01.1) и *H. parviporum* (учетная запись проекта PDUQ01.1).

В целом на основании проведенного исследования была составлена сводная таблица результатов диагностики для 26 образцов корневой губки как по морфологическим, так и по молекулярно-генетическим признакам (табл. 2). Как следует из таблицы 2, для разработанных видоспецифических (применительно к *H. parviporum* и *H. annosum*) праймеров не было выявлено абсолютной взаимосвязи между результатами ПЦР-амплификации. Так, наибольшее значение коэффициента корреляции (0,75) было выявлено для маркеров *HetParV1* и *HetParV2*, разработанных на основе геномных данных *H. parviporum* (учетная запись PDUQ01.1) и локализованных в различных скаффолдах (хромосомах) гриба. Значения коэффициентов корреляции для пар *HetAnn3* и *HetParV2*, *HetAnV2* и *HetParV2* не превысили 0,57 и 0,48 соответственно, что указывает на отсутствие общей направленности результатов диагностики. Наименьшее значение коэффициента корреляции (0,04) было отмечено для маркеров

HetAnn3 и *HetAnV2*, для дизайна праймеров которых были использованы нуклеотидные последовательности *H. annosum* (учетная запись проекта CVKZ01.1).

Наибольший уровень сходства результатов диагностики был выявлен для универсальных (по отношению к *H. parviporum* и *H. annosum*) маркеров *HetAllV3* и *HetAllV4*, несмотря на их различное происхождение, функции и хромосомную локализацию. Значение коэффициента корреляции для изученных образцов составило 1. Высокая конкордантность молекулярно-генетических признаков была также выявлена между парами маркеров *HetAllV3* и *HetParV2* — 0,92, *HetAllV4* и *HetParV2* — 0,92, *HetParV1* и *HetParV2* — 0,78, *HetAllV3* и *HetParV1* — 0,72, *HetAllV4* и *HetParV1* — 0,72.

Проведенный сравнительный анализ данных, полученных по полиморфному маркеру *HetAll2*, не позволил выявить закономерностей формирования генетического и генотипического разнообразия в сопоставлении с изученными морфологическими признаками и данными, полученными с использованием других маркеров.

Полученные результаты кросс-амплификации видоспецифических маркеров могут быть объяснены как индивидуальным характером изменчивости, диагностируемой у депозитов *H. parviporum* или *H. annosum* NCBI GenBank, так и, предположительно, наличием процессов интрогрессивной гибридизации между *H. parviporum* и *H. annosum* и, как следствие, формированием различных вариантов межвидовых гибридов.

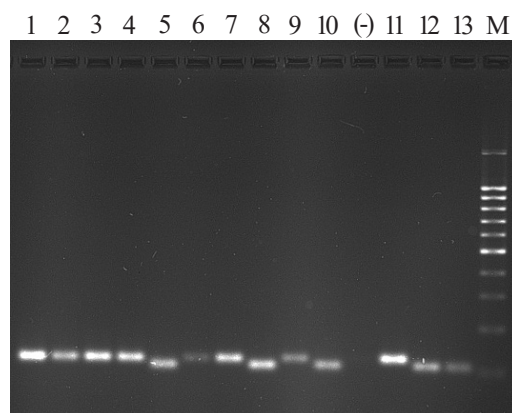


Рис. 1. Электрофореграмма ПЦР-продуктов изолятов *Heterobasidion* spp. (праймеры *HetAllV3F* и *HetAllV3R*)
Образцы: 1 — 1-11; 2 — 1-12; 3 — 1-13; 4 — 1-14; 5 — 2-3; 6 — 1-6; 7 — 2-5.3; 8 — 2-2; 9 — 2-9.2; 10 — 2-1;
11 — отриц. контроль; 12 — 2-9.6; 13 — 1-1; 14 — 1-2; M — маркер молекулярного веса

Таблица 2
Результаты молекулярно-генетической оценки образцов *Heterobasidium* spp.

Изолят	Место сбора	Тип образца	Тип гименофора	Опушение	NetAl2, п. н.	NetAnn3, п. н.	NetAnV2, п. н.	NetParV1, п. н.	NetParV2, п. н.	NetAlIV3, п. н.	NetAlIV4, п. н.
1-1	Беловежская пуца	П	м	+	130	–	–	117	106	102	149
1-2	Беловежская пуца	П	м	+	153	120	–	117	106	102	149
1-3	Неторельский уч. опыт. лесхоз	К			142/153/170	120	100	–	–	116	161
1-5	Полоцкий лесхоз	П	м	+/-	130	120	–	117	106	102	149
1-6	Узденский лесхоз	К			153/161	120*	100	–	–	116	116
1-7	Оршанский лесхоз	П	м	+	130	–	–	117	106	102	149
1-8	Узденский лесхоз	К			142/153/170	120	100	117*	–	116	161
1-9	Узденский лесхоз	К			142	–	100	–	–	116	116
1-10	Ивьевский лесхоз	П	м	+	130/161	120	–	117	106	102	149
1-11	Узденский лесхоз	К			153/161	120	100	117*	–	116	161
1-12	Узденский лесхоз	К			130/153/170	120	100	117	106*	116	161
1-13	Барановичский лесхоз	П	к	–	142/153/161	120	100	117	–	116	161
1-14	Барановичский лесхоз	П	к	–	130/153	120	100	–	–	116	161
2-1	Полоцкий лесхоз	П	м	+/-	153/161/170	120*	100	117	106	102	149

Окончание таблицы 2

Изолят	Место сбора	Тип образца	Тип гименофора	Опушение	HetAl2, п. н.	HetAnn3, п. н.	HetAnV2, п. н.	HetParV1, п. н.	HetParV2, п. н.	HetAnIV3, п. н.	HetAnIV4, п. н.
2-2	Ивьевский лесхоз	П	м	+	142/161	–	100	117	106	102	149
2-3	Ивьевский лесхоз	П	м	+	142/161	120*	100	117	106	102	149
2-4	Стародорожский опыт. лесхоз	П	к	–	153/161	120	80	–	–	116	161
2-5.1	Оршанский лесхоз	П	м	+	142	–	100	117	106	102	149
2-5.3	Оршанский лесхоз	П	к	–	161	120	80	117	–	116	161
2-7.1	Боровлянский спецлесхоз	П	ср	+/-	142/161	120*	100	117	106	102	149
2-7.2	Боровлянский спецлесхоз	П	м	+	142/161	–	100	117	106	102	149
2-7.3	Боровлянский спецлесхоз	П	к	–	153/161	120	80	–	–	116	161
2-7.4	Боровлянский спецлесхоз	П	м	+/-	142	–	100	117	106	102	149
2-8.1	Беловежская пуца	П	м	+	161	120*	100	117	106	102	149
2-9.2	Барановичский лесхоз	П	ср	–	153/161	120*	80	–	–	116	161
2-9.6	Барановичский лесхоз	П	к	–	153/161	120*	80	117	–	116	161

Примечание. Тип образца: П — плодовое тело, К — керна. Тип гименофора: к — крупнопоровый, ср — среднепоровый, м — мелкопоровый. Маркеры: * — слабая окраска ампликонов. Цветом обозначены ячейки, значения морфологических или молекулярных признаков в которых в наибольшей степени соответствуют *H. parviporum*

Заключение

Исходя из полученных результатов, видно, что межвидовые отличия между изолятами в равной степени обусловлены как вариациями в нуклеотидных последовательностях маркеров, так и внутригенными перестройками. На основании проведенной комплексной диагностики маркеры *HetAllV3* и *HetAllV4* рекомендованы для проведения молекулярно-генетической диагностики *H. parviporum* и *H. annosum*.

Работа выполнялась в рамках гранта БРФФИ B22M-055.

Список использованных источников

1. Niemelä, T. Taxonomy of the genus *Heterobasidion* / T. Niemelä, K. Korhonen // *Heterobasidion annosum: ecology, biology, impact and control* / edited by S. Woodward [et al.]. – Cambridge, 1998. – Ch. 2. – P. 27–33.
2. Mitchelson, K. Diagnosis and differentiation of intersterility groups / K. Mitchelson, K. Korhonen // *Heterobasidion annosum: ecology, biology, impact and control* / edited by S. Woodward [et al.]. – Cambridge, 1998. – Ch. 5. – P. 71–92.
3. Федоров, Н. И. Ферментативная активность разных штаммов корневой губки / Н. И. Федоров, Н. И. Стайченко, Л. М. Неустроева // Микология и фитопатология. – 1975. – Т. 9, № 3. – С. 235–239.
4. Korhonen, K. Intersterility groups of *Heterobasidion annosum* / K. Korhonen // *Commun. Inst. For. Fenn.* – 1978. – Vol. 94, № 6. – 25 p.
5. Otrosina, W. J. *Heterobasidion occidentale* sp. nov. and *Heterobasidion irregulare* nom. nov.: a disposition of North American *Heterobasidion* biological species / W. J. Otrosina, M. Garbelotto // *Fungal Biol.* – 2010. – Vol. 114. – P. 16–25.
6. Yuan Y. et al. An updated global species diversity and phylogeny in the forest pathogenic genus *Heterobasidion* (*Basidiomycota*, *Russulales*) // *Frontiers in Microbiology*. – 2020. – T. 11.
7. Житникова, М. В. Состав и распространение интерстерильных групп корневой губки в лесных насаждениях Беларуси / М. В. Житникова, Н. И. Федоров // Биология, систематика и экология грибов в природных экосистемах и агрофитоценозах: материалы международной научной конференции, Минск, 20–24 сент. 2004 г. / Ин-т эксперим. ботаники им. В.Ф. Купревича ; ред-кол.: О. С. Гапиенко [и др.]. – Минск, 2004. – С. 100–103.
8. Федоров, Н. И. Корневые гнили хвойных пород в лесах Беларуси / Н. И. Федоров // Проблемы лесоведения и лесоводства: сб. науч. тр. – Гомель : Ин-т леса НАН Беларуси, 2001. – Вып. 53. – С. 342–345.
9. Федоров Н. и др. Исследование прорастания базидиоспор корневой губки. – 1978.
10. Stenlid J. Regional differentiation in *Heterobasidion annosum* // 8. International Conference on Root and Butt Rots, Uppsala (Sweden), 9–16 Aug 1993. – *Sveriges Lantbruksuniv.*, 1994.
11. Piri T., Korhonen K. Infection of advance regeneration of Norway spruce by *Heterobasidion parviporum* // *Canadian journal of forest research*. – 2001. – T. 31, № 6. – С. 937–942.
12. Gunulf A. et al. Secondary spread of *Heterobasidion parviporum* from small Norway spruce stumps to adjacent trees // *Forest Ecology and Management*. – 2013. – T. 287. – С. 1–8.
13. Mitchelson, K. Diagnosis and differentiation of intersterility groups / K. Mitchelson, K. Korhonen // *Heterobasidion annosum: ecology, biology, impact and control* / edited by S. Woodward [et al.]. – Cambridge, 1998. – Ch. 5. – P. 71–92.
14. Karlsson, J.-O. Pectic isozyme profiles of Intersterility groups in *Heterobasidion annosum* / J.-O. Karlsson, J. Stenlid // *Mycol. Res.* – 1991. – Vol. 95, № 5. – P. 531–536.
15. Combined fatty acid and sterol profiles of *Heterobasidion annosum* intersterility groups S, P and F / M. M. Müller [et al.] // *Mycol. Res.* – 1995. – Vol. 99, № 9. – P. 1 025–1 033.
16. Differentiation of intersterility groups and geographic provenances among isolates of *Heterobasidion annosum* detected by random amplified polymorphic DNA assays / M. Garbelotto [et al.] // *Can. J. Bot.* – 1993. – Vol. 71, № 4. – P. 565–569.
17. Fabritius, A.-L. Variation in *Heterobasidion annosum* detected by random amplified polymorphic DNAs / A.-L. Fabritius, R. Karjalainen // *Eur. J. For. Path.* – 1993. – Vol. 23, № 4. – P. 193–200.
18. *Heterobasidion annosum* 5.8s ribosomal DNA and internal transcribed spacer sequence: rapid identification of European intersterility groups by ribosomal DNA restriction polymorphism / T. Kasuga [et al.] // *Current Genetics*. –

1993. – Vol. 24. – P. 433–436.

19. Stenlid, J. Intraspecific genetic variation in *Heterobasidion annosum* revealed by amplification of minisatellite DNA / J. Stenlid, J.-O. Karlsson, N. Högborg // *Mycol. Res.* – 1994. – Vol. 98. – P. 57–63.

20. Vainio, E. J. Variation of RAMS markers within the Intersterility groups of *Heterobasidion annosum* in Europe / E. J. Vainio, J. Hantula // *Eur. J. For. Pathol.* – 1999. – Vol. 29, № 3. – P. 231–246.

21. Hantula, J. Specific primers for the differentiation of *Heterobasidion annosum* (s. str.) and *H. parviporum* infected stumps in Northern Europe / J. Hantula, E. Vainio // *Silva Fennica*. – 2003. – Vol. 37, № 2. – P. 181–187.

22. Škipars, V. Detection of *Heterobasidion*

annosum in Scots pine trees using a polymerase chain reaction based methods / V. Škipars, D. Ruņģis // *Baltic Forestry*. – 2011. – Vol. 17, № 1. – P. 2–7.

23. Падутов, В. Е. Методы молекулярно-генетического анализа / В. Е. Падутов, О. Ю. Баранов, Е. В. Воропаев. – Минск: Юнипол, 2007. – 176 с.

24. Острикова, М. Я. Оценка зараженности почв корневой губкой на лесокультурных площадях / М. Я. Острикова // Сб. науч. тр. / Ин-т леса НАН Беларуси – Гомель, 2011. – Вып. 71: Проблемы лесоведения и лесоводства. – С. 480–488.

A. M. Nestyuk¹, S. V. Panteleev², V. A. Yarmolovich¹, O. Yu. Baranov^{1,3}

STUDYING OF THE STS-MARKERS POLYMORPHISM IN HETEROBASIDION ISOLATES INFECTING NORWAY SPRUCE (*PICEA ABIES* (L.) H.KARST.) IN BELARUS

¹Belarusian State Technological University,
13a Sverdlova St., 220006 Minsk, Republic of Belarus
e-mail: antonina.nestyuk95@gmail.com

²Institute of Forests, National Academy of Sciences of Belarus,
71 Proletarian St., 246050 Gomel, Republic of Belarus

³Department of Biological Sciences of the National Academy of Sciences of Belarus
66 Independence Ave., 220072 Minsk, Republic of Belarus

The article presents the results of studying the genetic polymorphism of *Heterobasidion* (root rot agent) isolates that infect Norway spruce (*Picea abies*) in various regions of Belarus. Based on the data obtained, a comparative assessment of the suitability of STS markers for species diagnostics of fungal isolates (*Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref. *sensu stricto* (s. s.) and *Heterobasidion parviporum* Niemelä & Korhonen) was carried out. Samples of the sporocarp and infected wood were collected in Norway spruce stands on the territory of three geobotanical subzones — in seven forestry enterprises of the Ministry of Forestry of the Republic of Belarus, on the territory of the Negorelsky educational and experimental forestry and the National Park "Belovezhskaya Pushcha". Based on the comprehensive analysis of the samples, markers for specific molecular genetic diagnosis of *H. annosum* and *H. parviporum* were recommended.

Keywords: root rot fungi, *Heterobasidion parviporum* Niemelä & Korhonen, *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref., species identification, molecular genetic analysis, STS markers.

Дата поступления в редакцию: 01 сентября 2022 г.

M. A. Vinter, I. S. Kazlouski, A. I. Zinchenko

CONSTRUCTION OF A BACTERIAL STRAIN FORMING INCLUSION BODIES, EXHIBITING DIADENYLATE CYCLASE ACTIVITY

State Scientific Institution
“Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus”
2 Kuprevich St., 220141 Minsk, Republic of Belarus
e-mail: rita.vinter.abc@gmail.com

Using Recombinant DNA Technology, the novel bacterial recombinant strain *Escherichia coli* DAC-22, a source of diadenylate cyclase that catalyzes the transformation of adenosine-5'-triphosphate into cyclic 3',5'-diadenylate (cyclo-di-AMP), was developed. The strain was derived by the transformation of *E. coli* Rosetta (DE3) pLysS cells with the recombinant plasmid pET42a+ wherein the *disA* gene responsible for the synthesis of the diadenylate cyclase of *Bacillus thuringiensis* was inserted. The producing capacity of the new strain with respect to diadenylate cyclase localized in catalytically active inclusion bodies equaled 720 units per liter of liquid culture. The newly engineered strain is destined for use in the technology related to the production of pharmaceutically promising cyclo-di-AMP.

Keywords: *Escherichia coli*, genetic engineering, recombinant strain, inclusion bodies, diadenylate cyclase, cyclo-di-AMP.

Introduction

Diadenylate cyclase (EC 2.7.7.85; DAC) catalyzes a reaction carrying out transformation of adenosine-5'-triphosphate (ATP) into cyclic 3',5'-diadenylate (cyclo-di-AMP) represented by the structural formula in figure 1. The aforementioned compound was discovered in 2008 as a component of gram-positive bacteria and archaea [1]. Cyclo-di-AMP plays a role of pathogen-associated molecular patterns triggering the synthesis of interferon and other anti-inflammatory cytokines upon their introduction into the body of humans and vertebrata. Such remarkable properties open attractive medical

prospects for cyclo-di-AMP both as a therapeutic agent [2] and a vaccine adjuvant [3, 4].

Nowadays cyclo-di-AMP is mainly produced by multistage eco-hostile chemical synthesis [5]. An alternative biocatalytic approach to the production of cyclo-di-AMP is grounded on the monophasic condensation of two ATP molecules under the impact of a bacterial enzyme — recombinant DAC.

It is evident that the application of cyclo-di-AMP in vaccines or for the induction of interferons will necessitate scaling the process up to an industrial level. The problem could be solved using genetically engineered bacterial

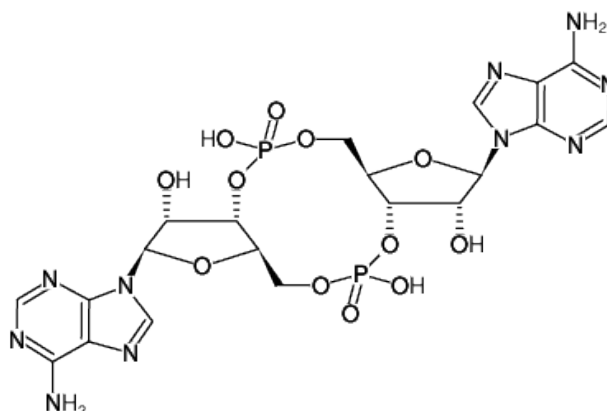


Fig. 1. Structural formula of cyclo-di-AMP

cultures capable of the hyperproduction of DAC. However, despite a solid investigation record and commercial advantages of *E. coli* strains, heterologous gene expression in these bacterial cells is often accompanied by an aggregation of superproduced target proteins into water-insoluble complexes named “inclusion bodies” [6, 7].

The enzymes integrated into inclusion bodies usually require a laborious solubilization procedure to recover their activities. However, rare cases are described in literature, where the procedure for refolding of inclusion bodies is not required, since precipitated enzymes do not lose their activity [8, 9].

It should be noted that DAC-producing strains are not obtained by trivial selection and genetic methods.

Experiments, resulting in recombinant strains able to produce elevated enzyme amounts following the induction of cloned DAC gene expression, have been reported on. For instance, the recombinant bacterial strain *Mycobacterium tuberculosis* BCG-disA-OE containing the DAC *disA* gene fused with the strong mycobacterial promoter *hsp60* in the pSD5vector was engineered. In comparison with a wild-type bacterial strain, the recombinant culture was distinguished by 300-times increased gene *disA* expression and 15-fold enhanced level of cyclo-di-AMP synthesis [10].

Regretfully, the expression of the gene encoding DAC was recorded by the authors only by measuring the amount of mRNA using real-time PCR. Data on the recombinant DAC activity measured in units per liter of liquid culture are not available and they can not be computed.

Three strain-DAC producers based on *E. coli* BL21(DE3) were engineered by the transformation of their cells with plasmids pGP 1973, pGP1974 and pGP1975 carrying the cloned genes of three different isoforms (DisA, CdA and CdaS) of DAC from bacteria *Bacillus subtilis* [11]. The findings allowing the estimation of the DAC-producing ability of bacterial strains in the units of activity per liter of liquid culture were not reported.

The previously known recombinant strain *E. coli* pBtdac resulted from the transformation of the recipient strain *E. coli* BL21(DE3) with the plasmid pET42a(+) wherein the gene, encoding DAC from *B. thuringiensis*, was inserted. The strain productivity with respect to DAC (localized in inclusion bodies) is relatively low constituting

330.75 units/L of liquid culture [12].

The aim of our work was to engineer the recombinant *E. coli* strain, exceeding in DAC biosynthetic potential the analogs described in its literature.

Materials and methods

The chromosomal DNA of the bacterial strain *B. thuringiensis* BT 407 (Novagen, USA) served as a source of the structural gene *disA* (GeneID: 67464740) encoding the DAC amino acid sequence. DNA was isolated by phenol-chloroform method with complementary cetavlon purification [13]. The *disA* gene was synthesized by the PCR technique using Flash polymerase (ArtBioTech, Belarus) and synthetic oligonucleotide primers: DisA_2-F (5'-GTGGTGGTCCACAACATGGA AGAAATAAGCAACGTG-3') and DisA_2-R (5'-GTGGTGGTGGTGGTCTCATTGTGTCTACTC ATATATAGATGCTCT-3'). Nucleotide sequences (underlined) complementary to the plasmid pET42a+ (Novagen, USA) were inserted into 5'-ends of the primers.

Amplification products were separated by electrophoresis in 1% agarose gel. The product, corresponding to the *disA* gene, was recovered and inserted into the vector pET42a+ prelinearized by the PCR technique, using primers 42Int_R (5'-GTTGTGGACCACCACCATATGTATATC TCCTTCTT-3') and pET42lin_2-F (5'-GAGCAT CACCATCACCACCACCACCACTAATTG-3') primers. The assembly of DNA fragments (the linearized vector and the DAC encoding gene) was conducted by prolonged overlap extension PCR method [14].

The resulting mixture was used to transform the competent cells of *E. coli* Rosetta (DE3) plysS (Novagen, USA) produced by the standard calcium method [13] with subsequent inoculation on the solid nutrient LB medium (1% tripton, 0.5% yeast extract, 1% NaCl, 1% glucose, and 2% agar-agar) comprising kanamycin in 50 µg/ml concentration. Grown separate colonies were analyzed for the presence of the *disA* gene insert by the PCR technique using the primer to the T7-promoter 5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3', incorporated into the plasmid pET24a+ and the *disA* primer — DisA_R.

Amplification products were subjected to electrophoresis in 1% agarose gel. Bacterial cells comprising the plasmid pET24a+ with the *disA*

gene insertion were selected. As a result, the recombinant bacterial strain of *E. coli* capable to produce the DAC of *B. thuringiensis* and designated as *E. coli* DAC-22 was derived.

10 ml of 24-hour cell culture of *E. coli* DAC-22 was inoculated into 2 Erlenmeyer flasks of 2 L volume, each containing 500 ml of the LB medium with kanamycin (50 µg/ml, pH 7.0) and was grown on the shaker at 37 °C and at an agitation rate of 200 rpm. The inducer — isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG; CarlRoth, Germany) in the final concentration of 0.5 mM was supplied into the medium reaching optical density 0.6 ($\lambda_{600\text{ nm}}$) and the culture continued for 2 h. Upon growth termination, the cells were precipitated by centrifuging (8 000 g, 5 min), resuspended in 50 mM phosphate buffer (pH 8.0) containing 300 mM NaCl and 10 mM imidazole.

Cells were disrupted by ultrasound in the Sonifier-450 instrument (Branson, USA). The insoluble fraction of the lysate was precipitated by centrifugation at 21 000 g for 20 min, then the precipitate containing inclusion bodies was washed with the 1 M urea solution, where Triton X-100 was added to the final concentration of 2%. After centrifugation, the pellet was washed twice with 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) containing 100 mM NaCl. The resulting 120 mg (dry weight) inclusion bodies were resuspended in 20 ml of the same buffer.

Gel electrophoresis of proteins was performed in 12% polyacrylamide gel with 4% sodium dodecyl sulfate. A protein molecular weight marker (BlueEye Prestained Protein Marker) was provided by Jena Bioscience (Germany). Quantification of the target protein was performed using the ChemiDoc Gel Documentation System (BioRad, USA) and the ImageLab software (BioRad, USA).

For the synthesis of cyclo-di-AMP, the obtained inclusion bodies were added to the reaction mixture (final volume 10 ml) containing (mM): MgCl_2 — 10, Tris-HCl-buffer (pH 8.0) — 10, ATP — 5, and incubated at 55 °C for 3 h. The course of the reaction was controlled by thin layer chromatography on the plates of Silica gel 60 F254 (Merck, Germany) in the system of solvents dioxane-water-25% ammonia (4:3:0.25). The reaction products were eluted from the plates with water and the concentration of substances in the eluates was determined spectrophotometrically

using the known for cyclo-di-AMP molar extinction coefficient of 27 000 ($\lambda_{259\text{ nm}}$).

Cyclo-di-AMP was isolated from the reaction mixture by chromatography on the DEAE-Toyopearl 650 M resin column (Toyo soda, Japan) (Cl⁻-form) using a linear NaCl gradient (0–500 mM). The eluate was concentrated 200 times with a rotary evaporator at 55 °C. The resulting solution was applied to the Sephadex G-10 column (Serva, Germany) and the end product was eluted with water. The precipitate was washed with cooled alcohol and dried in vacuo.

DAC activity was assayed as described earlier [15]. The amount of enzyme producing 1 µmole of cyclo-di-AMP in 1 min of the reaction process was defined as one unit of activity.

The experimental data presented in the work reflect the confidence interval of the arithmetic mean for 95% probability level.

Results and discussion

The shortcoming of the only found in literature strain-DAC producer with characterized activity is in its relatively low producing capacity with respect to the studied enzyme. This might be due to the inappropriate efficiency of heterologous gene expression in the recipient strain used to engineer of the recombinant variant.

The proposed strategy to create of a novel microbial source of DAC envisaged an idea of using *E. coli* Rosetta (DE3) plysS as the strain-recipient transformed by the plasmid pET42a(+) carrying the *disA* gene. The developed recombinant strain *E. coli* DAC-22 is distinguished by superior target protein productivity over the strain *E. coli* pBtdac [12].

Fig. 2 presents data evaluating the enzyme production level in the course of submerged cultivation.

It can be seen from the electrophoregram demonstrated in Figure 2 that the amount of protein with the molecular weight of 47 kDa corresponding to the target enzyme was significantly increased in the cultural fluid of the recombinant strain after induction with IPTG. According to calculations made by the gel documentation system, DAC accounted for about 70% of the total cell lysate protein, with approximately 90% of the enzyme localized in inclusion bodies.

The resulting inclusion bodies (1 ml) were

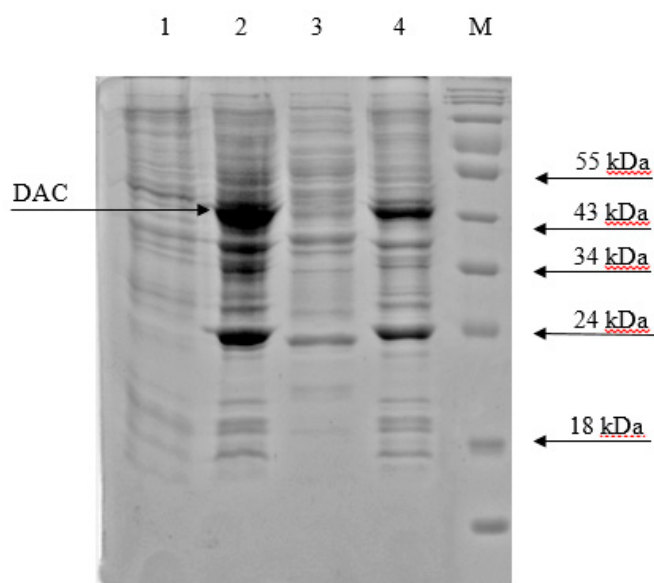


Fig. 2. Electrophoregram of the protein composition of *E. coli* DAC-22

Tracks: 1 — cell lysate before the induction; 2 — cell lysate after the induction; 3 — cell lysate supernatant; 4 — inclusion bodies; M — protein molecular weight markers

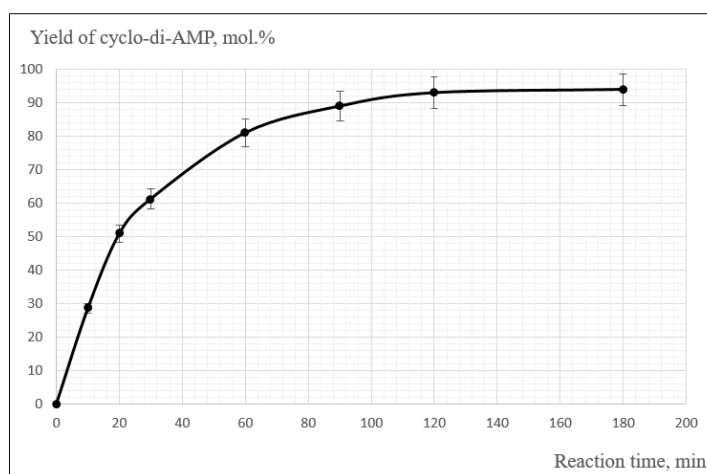


Fig. 3. Dynamics of cyclo-di-AMP accumulation in the reaction catalyzed by the inclusion bodies with recombinant DAC

added to the reaction mixture (with the final volume of 10 ml), comprising, mM: MgCl_2 — 10, Tris-HCl buffer (pH 8.0) — 10, ATP — 5 (50 μmol) and incubated at 55 °C for 2 h. Under these conditions (Fig. 3), the reaction yield reached more than 90% of theoretical maximum.

Based on the results obtained, the estimated production capacity of the strain expressed in the units of activity was calculated as 720 U/L of liquid culture.

Cyclo-di-AMP was recovered from the reaction mixture as described in the section "Materials and methods". 13 mg of chromatographically pure cyclo-di-AMP was produced. As a result, the yield

of the isolated end product calculated per initial ATP substrate constituted 75% of the maximum theoretical value.

Motility of the sample in the course of thin-layer chromatography on Silica gel 60 F_{254} plates (Merck, Germany) in the system of solvents dioxan-water-25% ammonia solvents (4:3:0.25), as well as UV spectral parameters of the product, totally matched the characteristics of the cyclo-di-AMP standard sample purchased from Jena Bioscience (Germany).

Thus, we demonstrated the possibility of applying of inclusion bodies for efficient cyclo-di-AMP synthesis. Such an approach to the production

and utilization of DAC enzyme preparations enables to raise the considerably productive potential of a microbial strain and it provides an opportunity of the repeated use of inclusion bodies in the relatively inexpensive technology of the production of cyclic dinucleotides and their marketing as a commercially attractive pharmaceuticals.

It should be noted that heterologous protein expression plays a key role in modern biotechnology. Formation of inclusion bodies during heterologous protein expression, especially the expression of eukaryotic proteins in prokaryote cell hosts, like *E. coli*, poses one of the most

intricate challenges for researchers and experts in this area. With a view of minimizing the appearance of inclusion bodies, and consequently, increasing the yield of soluble proteins, numerous strategies were initiated, including genetic methods, e.g. reducing the gene dosage, physical factors — a decline in fermentation temperature, physiological techniques — mixed culture with chaperons or nutrient limitation [16]. The outcome of applying of the above-mentioned procedures is unpredictable, so that it is not surprising that they failed to develop a generally recognized process protocol accepted with regard to all the proteins aggregating into inclusion bodies.

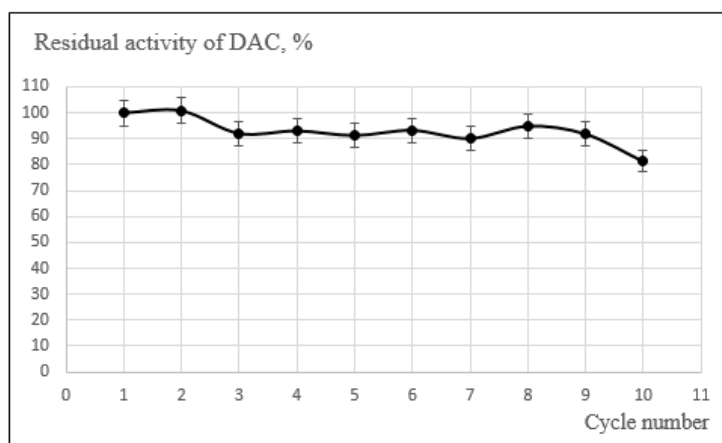


Fig. 4. Change in the DAC activity of inclusion body preparation during its repeated use in cyclo-di-AMP synthesis

On the other part, inclusion bodies represent relatively stable protein formations. They are readily isolated following cell disintegration in the course of simple physical manipulations and may act further as effective enzyme preparations, exemplified by several literature reports.

In order to verify the statement, we conducted experimental testing of the repeated use of inclusion bodies for cyclo-di-AMP biocatalysis. It follows from Figure 4 that inclusion bodies may be recycled at least 10 times for this purpose.

Conclusion

Relying on the genetic engineering experimental technique, the novel highly efficient recombinant bacterial strain producing an enzyme (DAC in particular) in the form of catalytically active inclusion bodies was constructed. The producing capacity of the new recombinant strain with respect to the DAC contained in catalytically active inclusion bodies was 720 units/L of liquid

culture, which is more than twice of the known strain-analog.

For the first time, it was demonstrated that inclusion bodies may be used as enzyme preparations for the repeated synthesis of pharmacologically promising cyclo-di-AMP.

References

1. Yin W., Cai X., Ma H., Zhu L., Zhang Y., Chou S.-H., Galperin M. Y., He J. A decade of research on the second messenger c-di-AMP. *FEMS Microbiology Reviews*, 2020, Vol. 44, no. 6, p. 701–724. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuaa019>
2. Esteves A. M., Papaevangelou E., Dasgupta P., Galustian C. Combination of interleukin-15 with a STING agonist, ADU-S100 analog: A potential immunotherapy for prostate cancer. *Frontiers in Oncology*, 2021, Vol. 11, art. 621550. DOI: 10.3389/fonc.2021.621550
3. Sanchez M. V., Ebensen T., Schulze K.,

- Cargnелutti D., Blazejewska P., Scodeller E. A. Intranasal delivery of influenza rNP adjuvanted with c-di-AMP induces strong humoral and cellular immune responses and provides protection against virus challenge. *PLoS ONE*, 2014, Vol. 9, no. 8, art. e104824. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0104824>
4. Lirussi D., Weissmann S. F., Ebensen T., Nitsche-Gloy U., Franz H. B. G., Guzman C. A. Cyclic di-adenosine monophosphate: a promising adjuvant candidate for the development of neonatal vaccines. *Pharmaceutics*, 2021, Vol. 13, no. 2, art. 188. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13020188>
5. Wang C., Hao M., Qi Q., Chen Y., Hartig J. S. Chemical synthesis, purification, and characterization of 3'-5'-linked canonical cyclic dinucleotides (CDNs). *Methods in Enzymology*, 2019, Vol. 625, p. 41–59. <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2019.04.022>
6. Villaverde A., Carrio M. M. Protein aggregation in recombinant bacteria: Biological role of inclusion bodies. *Biotechnology Letters*, 2003, Vol. 25, no. 17, p. 1385–1395. <https://doi.org/10.1023/a:1025024104862>
7. Schramm F. D., Schroeder K., Jonas K. Protein aggregation in bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 2020, Vol. 44, no. 1, p. 54–72. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuz026>
8. Shchokolova A. S., Rymko A. N., Kvach S. V., Shabunya P. S., Fatykhava S. A., Zinchenko A. I. Enzymatic synthesis of 2'-ara and 2'-deoxy analogues of c-di-GMP. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*, 2015, Vol. 34, no. 6, p. 416–423. <https://doi.org/10.1080/15257770.2015.1006775>
9. Kamel S., Walczak M. C., Kaspar F. Westarp S., Neubauer P., Kurreck A. Thermostable adenosine 5'-monophosphate phosphorylase from *Thermococcus kodakarensis* forms catalytically active inclusion bodies. *Scientific Reports*, 2021, Vol. 11, art. 16880. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-96073-5>
10. Singh A. K., Praharaj M., Lombardo K. A. Re-engineered BCG overexpressing cyclic di-AMP augments trained immunity and exhibits improved efficacy against bladder cancer. *Nature Communications*, 2022, Vol. 13, no. 1, art. 878. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-28509-z>
11. Mehne F. M., Gunka K., Eilers H. Cyclic di-AMP homeostasis in *Bacillus subtilis*: both lack and high level accumulation of the nucleotide are detrimental for cell growth. *The Journal of Biological Chemistry*, 2013, Vol. 288, no. 3, p. 2004–2017. <https://doi.org/10.1074/jbc.m112.395491>
12. Khmelevskaya K. S., Kazlovskij I. S., Zinchenko A. I. Use of recombinant diadenylate cyclase for the synthesis of cyclo-di-AMP. *Abstracts of the XI International scientific conference «Microbial biotechnologies: fundamental and applied aspects»* (Minsk, June 3-6, 2019), p. 114–115 (in Russian)
13. Green M. R., Sambrook J. *Molecular cloning: a laboratory manual*, fourth ed. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2012, 630 p.
14. Quan J., Tian J. Circular polymerase extension cloning of complex gene libraries and pathways. *PLoS ONE*, 2009, Vol. 4, no. 7, art. e6441. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006441>
15. Kazlovskij I. S., Radevich D. S., Rymko A. N., Shchokolova A. S., Kvach S. V., Zinchenko A. I. Construction of *Escherichia coli* strain, producing diadenylate cyclase and its application for cyclic di-AMP synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2015, no. 4, p. 51–55 (in Russian)
16. Bhatwa A., Wang W., Hassan Y. I., Abraham N., Li X.-Z., Zhou T. Challenges associated with the formation of recombinant protein inclusion bodies in *Escherichia coli* and strategies to address them for industrial applications. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2021, Vol. 9, art. 630551. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.630551>

М. А. Винтер, И. С. Казловский, А. И. Зинченко

СОЗДАНИЕ ШТАММА БАКТЕРИЙ, ОБРАЗУЮЩИХ ТЕЛЬЦА ВКЛЮЧЕНИЯ, ПРОЯВЛЯЮЩИХ ДИАДЕНИЛАТЦИКЛАЗНУЮ АКТИВНОСТЬ

Государственное научное учреждение
«Институт микробиологии Национальной академии наук Беларуси»
Республика Беларусь, 220141, г. Минск, ул. Купревича, 2
e-mail: rita.vinter.abc@gmail.com

С помощью техники рекомбинантной ДНК создан новый бактериальный рекомбинантный штамм *Escherichia coli* ДАЦ-22 — продуцент диаденилатциклазы, катализирующей реакцию трансформации аденозин-5'-трифосфата в циклический 3',5'-диаденилат (цикло-ди-АМФ). Штамм получен трансформацией клеток *E. coli* Rosetta (DE3) pLysS рекомбинантной плазмидой pET42a+, в которую встроен ген *disA*, ответственный за синтез диаденилатциклазы *Bacillus thuringiensis*. Продуцирующая способность нового штамма в отношении диаденилатциклазы, находящейся в составе каталитически-активных телец включения, составила 720 ед/л культуральной жидкости. Созданный штамм предназначен для использования в технологии получения фармакологически перспективного цикло-ди-АМФ.

Ключевые слова: *Escherichia coli*, генная инженерия, рекомбинантный штамм, тельца включения, диаденилатциклаза, цикло-ди-АМФ.

А. А. Муратова¹, О. В. Евдокимова¹, М. Н. Мандрик-Литвинкович¹, Л. Н. Валентович^{1,2},
М. А. Титок²

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ГЕНОВ, ВЛИЯЮЩИХ НА СИНТЕЗ ПИОВЕРДИНА БАКТЕРИЯМИ *PSEUDOMONAS BRASSICACEARUM* S-1

¹Государственное научное учреждение
«Институт микробиологии Национальной академии наук Беларуси»
Республика Беларусь, 220084, г. Минск, ул. Купревича, 2
e-mail: anya.muratova.93@mail.ru

²Белорусский государственный университет
Республика Беларусь, 220030, г. Минск, пр. Независимости, 4

В результате молекулярно-генетического и функционального анализа выявлен и охарактеризован ряд новых генетических детерминант, влияющих на синтез пиовердина бактериями *P. brassicacearum* S-1. Установлено, что инактивация генов, кодирующих Zn-зависимую пептидазу (*mtfA*), пептидазу семейства C39 (*GFU70_09550*), трансмембранный сенсорный белок (*bvgS*), транспортер гема (*csmC*) и белок с неизвестной функцией (*vdgA*), приводила к изменению флуоресценции, эффективности синтеза пиовердина и антимикробной активности у штамма *P. brassicacearum* S-1. В хромосоме исследуемых бактерий обнаружен ранее неописанный генетический локус, определяющий синтез пиовердина. Показано, что направленная инактивация данного локуса приводила к полному отсутствию флуоресценции и продукции пиовердина бактериями *P. brassicacearum* S-1, а также к утрате способности подавлять рост фитопатогенного гриба *Fusarium oxysporum* БИМ F-798.

Ключевые слова: *Pseudomonas brassicacearum*, сидерофоры, флуоресценция, мутагенез, антагонистическая активность.

Введение

В настоящее время в растениеводстве требуются биопрепараты на основе живых культур микроорганизмов, имеющие ряд значимых преимуществ по сравнению с традиционными синтетическими пестицидами. В частности, они не накапливаются в почве, не обладают фитотоксичными свойствами и не влияют на биоразнообразие природных экосистем [1]. Основу биопрепаратов для защиты растений обычно составляют штаммы с известной генетической организацией, обладающие комплексной антимикробной и фитостимулирующей активностью. К таким микроорганизмам относятся представители почвенных бактерий рода *Pseudomonas*, которые способны синтезировать широкий спектр практически значимых метаболитов (фитогормонов, сидерофоров, витаминов, ферментов и др.) [2]. На основе бактерий *Pseudomonas brassicacearum* S-1 в Институте микробиологии НАН Беларуси разработан биопестицид

«Экогрин» для защиты овощных и зеленных культур от фитопатогенов [3]. Для генетической характеристики данного штамма было проведено полногеномное секвенирование (код доступа нуклеотидной последовательности штамма S-1 в базе данных GenBank — CP045701). Анализ полученных данных позволил выявить целый ряд генетических детерминант, определяющих синтез метаболитов и ферментов, предположительно обеспечивающих антимикробные и ростостимулирующие свойства штамма *P. brassicacearum* S-1 [4]. В частности, была установлена локализация *pvd*, *phl* и *hcn*-оперонов, определяющих синтез пиовердина, 2,4-диацетилфлороглюцинола и цианида соответственно. Данные соединения активны в отношении бактериальных и грибных патогенов хозяйственно ценных культур. Ранее был проведен молекулярно-генетический и функциональный анализ *phl* [5] и *hcn*-оперонов [6], определена роль 2,4-диацетилфлороглюцинола и циани-

да в антагонистической активности штамма *P. brassicacearum* S-1. Помимо вышеуказанных метаболитов, научный и практический интерес представляют пиовердины (или псевдобактины) — флуоресцирующие пигменты, продукция которых в основном характерна для бактерий рода *Pseudomonas*. Данные пигменты относятся к группе сидерофоров, обладающих высоким сродством к ионам трехвалентного железа (Fe^{3+}) [7]. Секретируемые бактериями во внешнюю среду сидерофоры связывают ионы Fe^{3+} и транспортируют его в составе комплексов обратно в бактериальную клетку, где трехвалентное железо высвобождается, восстанавливается до двухвалентного состояния и включается в процессы клеточного метаболизма [8]. Поскольку во внешней среде чаще всего наблюдается дефицит данного элемента, являющегося жизненно важным для почвенных микроорганизмов, они конкурируют между собой за его связывание. Штаммы почвенных псевдомонад, способные снижать доступность железа для фитопатогенов, ингибируют их рост [9–11]. Помимо антагонистической активности, пиовердины способствуют росту растений за счет способности переводить железо в доступную для них форму [12].

Знание механизмов синтеза пиовердина необходимо для детального изучения и направленного использования биотехнологически важных штаммов микроорганизмов [13]. В соответствии с вышесказанным, целью настоящей работы являлся молекулярно-генетический и функциональный анализ генетических детерминант, определяющих синтез пиовердина бактериями *P. brassicacearum* S-1 и определение роли данного сидерофора в антагонистической активности исследуемого штамма.

Материалы и методы

Использованные в работе штаммы микроорганизмов и плазмиды перечислены в таблице 1. Глубинное культивирование бактерий осуществляли в полноценной среде LB [14] или минимальной среде Мейнелла [15] с аэрацией (200 об/мин) при температуре 28–30 °C в течение 24–48 ч. Бактерии *Escherichia coli* выращивали при 37 °C в среде LB в течение 12–14 ч, с перемешиванием 120–160 об/мин. Грибные патогены выращивали в картофельно-глюкозном бульоне [16] с перемешиванием 120–160 об/мин при температуре 22 °C.

В работе использовали коммерческие препараты в конечных концентрациях: канами-

Таблица 1

Характеристика штаммов микроорганизмов и плазмид, использованных в работе

Штаммы, плазмиды	Характеристика	Источник
<i>Alternaria alternata</i> БИМ F-462	возбудитель альтернариоза огурца	Белорусская коллекция непатогенных микроорганизмов
<i>Colletotrichum lupini</i> БИМ F-397	возбудитель антракноза люпина	
<i>Pseudomonas syringae</i> БИМ B-280	возбудитель бактериального ожога сои	
<i>Fusarium oxysporum</i> БИМ F-798	возбудитель корневой гнили томата	
<i>Xanthomonas campestris</i> БИМ B-634	возбудитель сосудистого бактериоза капусты, моркови	
<i>Escherichia coli</i>		
XL1-Blue	F'proAB lacI ^q lacZΔM15 Tn10(Tet ^R)/recA1 endA1 gyrA96(Nal ^R) thi-1 hsdR17(r _k ⁺ m _k ⁺) supE44 relA1 lac	[17]
BW19851	RP4-2(Km::Tn7,Tc::Mu-1) ΔuidA3::pir ⁺ recA1, endA1 thiE1 hsdR17 creC510 zbf15	[18]
S17-1	thi rspL (Str ^R) endA sbcB15 sbcC hsdR (r _k ⁺ m _k ⁺) Δ(lac- proAB) [F' traD36 lacI ^q Δ(lacZ)M15 proA ⁺ B ⁺] λ pir ⁺	[19]

Окончание таблицы 1

Штаммы, плазмиды	Характеристика	Источник
<i>Pseudomonas brassicacearum</i>		
S-1 (БИМ В-446 Д)	Ery ^R , содержит спонтанную хромосомную мутацию, определяющую устойчивость к эритромицину, получен из штамма <i>P. brassicacearum</i> S	Белорусская коллекция непатогенных микроорганизмов
S-1-pvdX	Ery ^R , Km ^R , в хромосоме <i>P. brassicacearum</i> S-1 имеется инсерция плазмиды pK18mob:: <i>pvdX</i>	получены в данной работе
18	Ery ^R , Km ^R , в хромосоме <i>P. brassicacearum</i> S-1 инактивирован ген <i>mtfA</i> путем встраивания транспозона mini-Tn5 <i>xylE</i> , детерминирующего устойчивость к канамицину	
20	Ery ^R , Km ^R , в хромосоме <i>P. brassicacearum</i> S-1 инактивирован ген <i>GFU70_09550</i> путем встраивания транспозона mini-Tn5 <i>xylE</i> , детерминирующего устойчивость к канамицину	
26	Ery ^R , Km ^R , в хромосоме <i>P. brassicacearum</i> S-1 инактивирован ген <i>udgA</i> путем встраивания транспозона mini-Tn5 <i>xylE</i> , детерминирующего устойчивость к канамицину	
36	Ery ^R , Km ^R , в хромосоме <i>P. brassicacearum</i> S-1 инактивирован ген <i>bvgS</i> путем встраивания транспозона mini-Tn5 <i>xylE</i> , детерминирующего устойчивость к канамицину	
63	Ery ^R , Km ^R , в хромосоме <i>P. brassicacearum</i> S-1 инактивирован ген <i>cstC</i> путем встраивания транспозона mini-Tn5 <i>xylE</i> , детерминирующего устойчивость к канамицину	
Плазмиды		
pJET1.2	Ap ^R , P _{<i>lacUV5</i>} , <i>eco47IR</i> , oriV _{ColE1}	[20]
pUC19	Ap ^R , oriV _{ColE1}	[21]
pUT::mini-Tn5 <i>xylE</i>	Ap ^R ; Km ^R , oriR6K, <i>mob</i> RP4, полилинкер от M13tg131, <i>tnp</i> , <i>xylE</i>	[22]
pK18mob	Km ^R , pMB1, <i>mob</i> , pLac oriR _{p4}	[23]
pK18mob:: <i>pvdX</i>	pK18mob со вставкой гена <i>GFU70_19300</i> по сайту SmaI	получена в данной работе

цин и эритромицин — 50 мкг/мл; ампициллин — 100 мкг/мл; для бело-голубой селекции использовали изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид — 0,5 ммоль/л, 5 бром-4-хлор-3-индолил-бета-D-галактопиранозид — 50 мкг/мл.

Тотальную и плазмидную ДНК выделяли с использованием наборов реактивов «Bacteria DNA Preparation Kit» (PP-214L, Jena

Bioscience) и «GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit» (K0503, Thermo Fisher Scientific).

Для проведения полимеразной цепной реакции использовали реактивы фирм АртБиоТех или Праймтех (Республика Беларусь). Реакционная смесь (50 мкл) содержала ≈ 100 нг ДНК матрицы, 0,2 ммоль/л каждого дНТФ, 0,2 мкмоль/л каждого праймера, Flash ДНК-поли-

меразу (1,25 ед.) и АМ-буфер (1×). Проверка на наличие шпильчатых структур в пределах праймеров и определение температуры отжига проводилась с помощью программы Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) и онлайн-олигокалькулятора Олиго Кальк (<http://www.bio.bsu.by/molbiol/oligo.html>).

Для амплификации фрагмента гена *GFU70_19300* (обозначенного далее по тексту как ген *pvdX*) использовали праймеры *pvd-F* (5'-GACCAACTGATCCGGATGC-3') и *pvd-R* (5'-GCTGTATTCTTGTGAGCAG-3') при режиме: 98 °С — 3 мин (1 цикл); 98 °С — 15 сек, 52 °С — 15 сек, 72 °С — 1 мин (30 циклов); 72 °С — 3 мин (1 цикл).

Электрофоретический анализ осуществляли в 0,8% агарозном геле с бромистым этидием (в конечной концентрации 0,1%) при напряженности электрического поля 8–10 В/см. В качестве загрузочного буфера использовали 6× DNA Gel Loading Dye (R0611, Thermo Fisher Scientific), в качестве маркера молекулярного веса ДНК — GeneRuler 1 kb DNA Ladder (SM0311, Thermo Fisher Scientific). Результаты визуализировали с помощью системы цифровой фотодокументации производства Bio-Rad.

Выделение фрагмента ДНК нужного размера после электрофоретического разделения в агарозном геле проводили с помощью наборов «GeneJET Gel Extraction Kit» (K0691, Thermo Fisher Scientific) или «Monarch® DNA Gel Extraction Kit» (T1020S, New England Biolabs) в соответствии с протоколами производителей. Рестриктию плазмидной и тотальной ДНК, лигирование осуществляли в условиях, рекомендуемых фирмой-изготовителем (Thermo Fisher Scientific). Трансформацию бактерий *E. coli* осуществляли согласно методическим рекомендациям, изложенным в руководстве Дж. Сэмбрука с соавт. [24].

Перенос транспозона *mini-Tn5xylE* в бактерии *P. brassicacearum* S-1 и направленную инактивацию генов осуществляли методом конъюгации [25]. В качестве штаммов-доноров использовали бактерии штамма *E. coli* S17-1 [*pUT::mini-Tn5xylE*] для транспозонного мутагенеза и *E. coli* BW19851 [*pK18mob::pvdX*] для направленного мутагенеза. Клетки донора и реципиента в стационарной фазе роста сгущали в 5 раз, сме-

шивали в соотношении 1:1 и наносили на стерильные мембранные фильтры (Synpor 6, размер пор 0,45 мкм), помещенные на поверхность полноценной агаризованной среды в чашках Петри. Скрещиваемые бактерии инкубировали в течение 48 ч при 30 °С, после чего клетки смывали физиологическим раствором и из соответствующих разведений высевали на селективные среды.

Определение антимикробной активности проводили в трех биологических повторностях с помощью метода отсроченного антагонизма [26], расчеты проводили с учетом стандартного отклонения. Достоверность различия средних величин устанавливали с помощью t-критерия Стьюдента. За уровень статистической значимости принимался порог $p < 0,05$ [27].

Наличие флуоресценции регистрировали на агаризованной среде Кинг В [28]. Детекцию пиовердина проводили с помощью хроматографа «HPLC Shimadzu LC-30 Nexera» (Shimadzu). Разделение компонентов осуществляли с использованием метода высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на колонке Luna 5 мкм C18 150 мм × 4,6 мм (Phenomenex). Анализ проводили в режиме градиентного элюирования, в качестве подвижной фазы использовали 17 mM NaOH-ацетатный буфер (pH 5,3, раствор А) и 100% ацетонитрил (раствор Б). Программа ВЭЖХ была следующей: 100% раствора А, 1 мин; от 100% раствора А до 97% раствора А, 2 мин; 97% раствор А, 9 мин; от 97% раствора А до 30% раствора А, 25 мин при скорости потока 1 мл/мин. Объем инъекции 5 мкл, регистрация сигнала осуществлялась с помощью детектора диодной матрицы в УФ диапазоне 190–450 нм.

Визуализацию генов осуществляли с помощью программы SnapGene Viewer 5.2. Сравнение аминокислотных и нуклеотидных последовательностей проводили с использованием программ BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) и баз данных NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Поиск генов, предположительно ответственных за синтез вторичных метаболитов, проводили с помощью веб-сервера antiSMASH v5.2.0 [29].

Для определения последовательностей отдельных генетических детерминант по Сенгеру [30] использовали набор

DNA Cycle Sequencing Kit Jena Bioscience GmbH (Германия) и праймеры Tn5-OE-seq (5'-GCCGCACTTGTGTATAAG-3'), Tn5-IE-seq (5'-TAGGCGGCCAGATCTGATC-3') (Прайм-тех, Республика Беларусь). Продукты секвенирующей реакции детектировали с помощью автоматического секвенатора 4300 DNA Analyzer, Li-COR (США). Полученные результаты расшифровывали с помощью программы eSeq Version 3.1 Li-COR (США).

Результаты и обсуждение

В результате автоматической аннотации генома бактерий *P. brassicacearum* S-1 были выявлены гены (*pvdSL*, *pvdPMNOELJD*, *pvdH*, *pvdA* и *fpvI*), способные определять синтез пиовердина у исследуемого штамма. Данные детерминанты являлись достаточно консервативными и присутствовали в хромосомах ряда бактерий рода *Pseudomonas* (табл. 2).

Для поиска дополнительных генетических

Таблица 2

Гены, определяющие продукцию пиовердина у штамма *P. brassicacearum* S-1

Номер локуса (ген)	Размер, п. н.	Продукт гена	Штаммы со схожими генами	Идентичность, %
GFU70_08745 (<i>pvdS</i>)	549	сигма фактор РНК-полимеразы	<i>P. brassicacearum</i> 3Re2-7 (CP034725.1) <i>P. brassicacearum</i> LBUM300 (CP012680.1)	98,36 98,18
GFU70_08750 (<i>pvdL</i>)	12 987	нерибосомная пептидсинтетаза	<i>P. brassicacearum</i> LBUM300 (CP012680.1) <i>P. brassicacearum</i> 3Re2-7 (CP034725.1)	94,38 94,36
GFU70_19275 (<i>pvdP</i>)	1 617	PvdJ/PvdD/PvdP-подобный белок	<i>Pseudomonas</i> sp. St386 (AP021900.1) <i>P. brassicacearum</i> 3Re2-7 (CP034725.1)	94,36 94,30
GFU70_19280 (<i>pvdM</i>)	1 371	пиовердин-производящий дипептидазоподобный белок PvdM	<i>P. brassicacearum</i> 3Re2-7 (CP034725.1) <i>P. fluorescens</i> FW300-N2C3 (CP012831.1)	96,28 95,33
GFU70_19285 (<i>pvdN</i>)	1 281	аминотрансфераза класса V-кратных PLP-зависимых ферментов	<i>P. brassicacearum</i> 3Re2-7 (CP034725.1) <i>P. brassicacearum</i> LBUM300 (CP012680.1)	95,09 94,85
GFU70_19290 (<i>pvdO</i>)	876	белок семейства формилглицин-генерирующих ферментов	<i>P. brassicacearum</i> 3Re2-7 (CP034725.1) <i>Pseudomonas</i> sp. St290 (AP014703.1)	95,66 90,99
GFU70_19295 (<i>pvdE</i>)	1 659	АВС-транспортер для переноса циклических пептидов	<i>P. brassicacearum</i> 3Re2-7 (CP034725.1) <i>P. brassicacearum</i> L13-6-12 (CP014693.1)	95,96 90,90
GFU70_19315 (<i>pvdI</i>)	3 225	белок, содержащий домен аденилирования аминокислот	<i>P. brassicacearum</i> L13-6-12 (CP014693.1) <i>P. brassicacearum</i> 3Re2-7 (CP034725.1)	95,42 95,32
GFU70_19320 (<i>pvdJ</i>)	13 701	нерибосомная поликетидсинтаза	<i>Pseudomonas</i> sp. St386 (AP021900.1) <i>P. brassicacearum</i> L13-6-12 (CP014693.1)	95,49 95,38

Окончание таблицы 2

Номер локуса (ген)	Размер, п. н.	Продукт гена	Штаммы со схожими генами	Идентичность, %
GFU70_19325 (<i>pvdD</i>)	12 915	нерибосомная поликетидсинтаза	<i>Pseudomonas</i> sp. St386 (AP021900.1) <i>P. brassicacearum</i> WCS365 (CP089973.1)	94,97 94,90
GFU70_08785 (<i>pvdH</i>)	1 413	аспартат-аминотрансфераза	<i>P. brassicacearum</i> 3Re2-7 (CP034725.1) <i>P. brassicacearum</i> L13-6-12 (CP014693.1)	94,83 94,76
GFU70_19235 (<i>pvdA</i>)	1 335	L-орнитин-N5-оксигеназа	<i>P. brassicacearum</i> 3Re2-7 (CP034725.1) <i>P. brassicacearum</i> NFM421 (CP002585.1)	95,06 94,83
GFU70_19240 (<i>fpvI</i>)	483	сигма фактор РНК-полимеразы	<i>P. brassicacearum</i> 3Re2-7 (CP034725.1) <i>P. fluorescens</i> FW300-N2E2 (CP015225.1)	97,31 96,89

детерминант, способных определять синтез пиовердина использовали два подхода. Первый заключался в анализе ранее отобранных в результате транспозонного мутагенеза вариантов бактерий *P. brassicacearum* S-1, не способных синтезировать флуоресцирующий пигмент [31]. Второй подход базировался на данных информативного анализа.

На первом этапе для транспозонных мутантов (обозначены как 18, 20, 26, 36, 63) определяли место локализации транспозона *mini-Tn5xyIE*. Для этого из клеток мутантных бактерий выделяли тотальную ДНК, обрабатывали эндонуклеазой PstI (сайт узнавания отсутствует в пределах транспозона *mini-Tn5xyIE*) и лигировали с плазмидой pUC19,

предварительно обработанной этим же ферментом. Гибридные конструкции, содержащие фрагмент(ы) хромосомы, окаймляющий(е) транспозон, использовали в качестве матриц для секвенирующей реакции с праймерами, отжигающимися на концах транспозона.

В результате было определено, что инсерция транспозона произошла в генетические детерминанты *mtfA*, *GFU70_09550*, *ydgA*, *bvgS* и *csmC*, определяющие синтез белков с разной функциональной активностью, роль которых в синтезе пиовердина ранее для бактерий вида *P. brassicacearum* не изучалась (табл. 3). Тем не менее снижение синтеза данного сидерофора регистрировали для всех исследованных мутантных штаммов (табл. 4).

Таблица 3

Характеристика генетических детерминант, определяющих синтез флуоресцирующего пигмента у бактерий *P. brassicacearum* S-1

№ штамма	Номер локуса (кодированный белок)	Предполагаемая функция белка	Известные белки бактерий (код доступа), сходные с белком штамма S-1	Идентичность, %
18	GFU70_25165 (MtfA)	Регуляция работы глюкозо-фосфотрансферазной системы бактерий	Цинк-зависимая пептидаза (MBO1540474.1) <i>Pseudomonas</i> sp. OA65	98,89
			Цинк-зависимая пептидаза (WP_207280677.1) <i>Pseudomonas</i> sp. FW300-N2F2	98,52

Окончание таблицы 3

№ штамма	Номер локуса (кодируемый белок)	Предполагаемая функция белка	Известные белки бактерий (код доступа), сходные с белком штамма S-1	Идентичность, %
20	GFU70_09550*	Расщепление лидерных пептидов	Пептидаза семейства C39 (NUT83865.1) <i>P. brassicacearum</i> C2F7	100,00
			Белок с неизвестной функцией (AEA68025.1) <i>P. brassicacearum</i> NFM421	96,50
26	GFU70_00985 (YdgA)	Функция неизвестна	YdgA (NUT84431.1) <i>P. brassicacearum</i> C2F7	99,80
			Белок с неизвестной функцией (KIR14961.1) <i>P. fluorescens</i> DSM 8569	98,20
36	GFU70_05180 (BvgS)	Реакция клеток в условиях дефицита ионов железа	Гистидинкиназа (OOG87969.1) <i>Pseudomonas</i> sp. A25	94,08
			Сенсорный белок (EPJ81229.1) <i>Pseudomonas</i> sp. CFII68	94,08
63	GFU70_07935 (CcmC)	Экспортер гема для цитохрома C	CcmC (EIK64745.1) <i>P. fluorescens</i> Q8r1-96	100,00
			CcmC (AEA67708.1) <i>P. brassicacearum</i> NFM421	100,00

Примечание. * – белок не обозначен

Таблица 4

Содержание пиовердина в культуральных жидкостях мутантных бактерий
P. brassicacearum S-1

Штамм	Площадь пика	Относительное содержание пиовердина, %
<i>P. brassicacearum</i> S-1	664 022	100,0
18	69 285	10,4
20	5 288	0,8
26	137 365	20,7
36	179 074	26,9
63	43 229	6,5

Для поиска локусов, предположительно связанных с синтезом вторичных метаболитов с антимикробной активностью, использовали программу antiSMASH.

В результате в хромосоме бактерий *P. brassicacearum* S-1 был обнаружен генетический локус, предположительно связанный с синтезом пиовердина (рис. 1). В составе

локуса выявлен ряд генов, в том числе *pvdX* (GFU70_19300), функция которого ранее никем не изучалась. Было установлено, что ген *pvdX* предположительно кодирует белок (1 387 а. о., pI 5,66), содержащий функционально значимый домен (507–994 а. о.), определяющий аденилирование аминокислот A_NRPS_Cytcl-like (cd17643). Данный полипептид наиболее сходен с белками, кодируемыми хромосомными генами бактерий

P. brassicacearum C2F7 (NUT83944.1, идентичность 98,32%) и *P. brassicacearum* Delaware (ROM94814.1, идентичность 94,53%). Следует отметить, что подобный функциональный домен входит в состав пиовердинсинтетазы D (PvdD) и сиринопептинсинтетазы патогенных бактерий *P. aeruginosa* и *P. syringae* [32].

Для определения роли нерибосомной пептидсинтетазы PvdX в синтезе пиовердина бактериями *P. brassicacearum* S-1 использо-



Рис. 1. Генетическая карта локуса, определяющего синтез пиовердина у бактерий *P. brassicacearum* S-1

вали метод направленного мутагенеза. Для этого был амплифицирован фрагмент гена *pvdX* размером 4 132 п. н., который лигировали с плазмидой pK18mob, лианизированной рестриктазой SmaI. Полученной гибридной конструкцией трансформировали бактерии штамма *E. coli* BW19851, содержащего в хромосоме *tra*-область плазмиды группы IncP-1. Направленный мутагенез осуществляли путем передачи плазмиды pK18mob::*pvdX* из клеток *E. coli* BW19851 в бактерии *P. brassicacearum* S-1 методом конъюгации. Поскольку плаزمида pK18mob::*pvdX* не поддерживается в клетках

псевдомонад, появление канамицинрезистентных трансконъюгантов возможно только при встраивании гибридной конструкции в состав хромосомы за счет гомологичной рекомбинации по идентичным нуклеотидным последовательностям гена *pvdX*. В результате были отобраны мутантные варианты *P. brassicacearum* S-1-*pvdX* не способные синтезировать флуоресцирующий пигмент и продуцировать пиовердин (рис. 2).

Для всех отобранных мутантных вариантов бактерий *P. brassicacearum* S-1 определяли антимикробную активность (табл. 5). Для

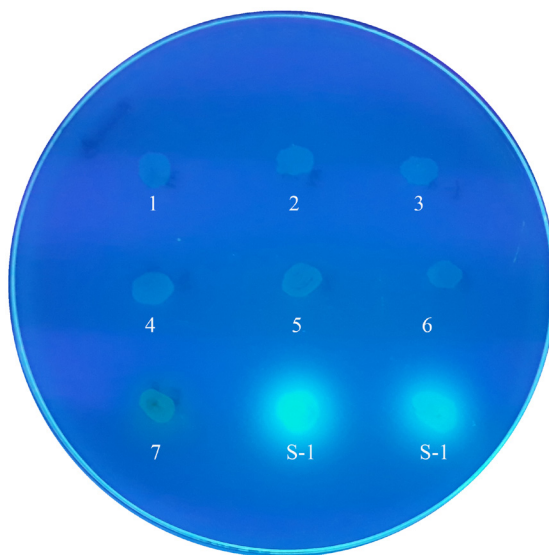


Рис. 2. Колонии мутантных бактерий *P. brassicacearum* S-1-*pvdX* (клоны 1–7). Исходный штамм *P. brassicacearum* S-1 соответствует обозначению S-1

этого у выбранных транспозонных мутантов и у штамма *P. brassicacearum* S-1-pvdX была проверена способность подавлять рост грибных и бактериальных фитопатогенов. В результате было установлено, что транспозонные мутанты с нарушенными генами *mtfA* (мутант № 18), *ydgA* (мутант № 26), *bvgS* (мутант № 36) и *csmC* (мутант № 63) проявляли в сравнении с исходным штаммом повышенную в 1,2–1,6 раз антимикробную активность по отношению к патогенам *X. campestris*,

A. alternata, *C. lupini*. У мутанта с нарушенным геном *GFU70_09550* (мутант № 20) антимикробная активность сохранилась на уровне дикого типа по отношению к патогенам *X. campestris*, *P. syringae* и *A. alternata*, но пропадала по отношению к грибам *C. lupini* и *F. oxysporum*. У штамма *P. brassicacearum* S-1-pvdX снижалась активность по отношению ко всем исследованным патогенам (за исключением *P. syringae*) и полностью отсутствовала по отношению к *F. oxysporum*.

Таблица 5

Антагонистическая активность мутантных бактерий

Штамм	Зоны задержки роста фитопатогенов, мм				
	<i>X. campestris</i>	<i>P. syringae</i>	<i>A. alternata</i>	<i>C. lupini</i>	<i>F. oxysporum</i>
18	27,0 ± 0,5*	27,0 ± 0,6*	24,0 ± 0,7*	32,0 ± 0,4*	23,0 ± 0,5*
20	22,0 ± 0,4*	21,0 ± 0,5	17,3 ± 0,4	—	—
26	31,0 ± 0,5*	24,0 ± 0,7*	22,0 ± 0,5*	34,0 ± 0,5*	22,0 ± 0,4
36	29,0 ± 0,7*	19,0 ± 0,4	28,0 ± 0,4*	30,0 ± 0,7*	23,0 ± 0,7*
63	28,0 ± 0,7*	20,0 ± 0,5	24,0 ± 0,6*	29,0 ± 0,7*	22,3 ± 0,4
<i>P. brassicacearum</i> S-1-pvdX	13,5 ± 0,5*	18,0 ± 0,5	15,0 ± 0,5*	18,0 ± 0,6*	—
<i>P. brassicacearum</i> S-1	20,0 ± 0,4	19,0 ± 0,7	19,0 ± 0,4	22,0 ± 0,6	20,0 ± 0,7

Примечание. * — статистически значимые по t-критерию Стьюдента различия с контролем

Таким образом, в хромосоме бактерий *P. brassicacearum* S-1 выявлен ряд новых генетических детерминант, продукты которых влияли не только на синтез пиовердина, но и играли роль в синтезе антимикробных метаболитов, активных в отношении определенных видов фитопатогенов.

Заключение

В результате проведенных исследований методом транспозонного мутагенеза выявлен ряд генов (*mtfA*, *GFU70_09550*, *ydgA*, *bvgS*, *csmC*), продукты которых влияли на синтез пиовердина и антимикробную активность бактерий *P. brassicacearum* S-1. Связь данных генетиче-

ских детерминант с продукцией пиовердина для бактерий вида *P. brassicacearum* установлена впервые. Показано, что направленная инактивация оперона генов синтеза нерибосомной пептидсинтетазы PvdX приводила к неспособности штамма *P. brassicacearum* S-1-pvdX продуцировать пиовердин и подавлять рост фитопатогенного штамма *F. oxysporum* БИМ F-798.

Список использованных источников

1. Pylak, M. Review report on the role of bioproducts, biopreparations, biostimulants and microbial inoculants in organic production of fruit / M. Pylak, K. Oszust, M. Frac // Rev. Environ. Sci. Biotechnol. – 2019. – Vol. 18, № 3. – P. 597–616.

2. Genetic Potential of the Biocontrol Agent *Pseudomonas brassicacearum* (Formerly *P. trivialis*) 3Re2-7 Unraveled by Genome Sequencing and Mining, Comparative Genomics and Transcriptomics / J. Nelkner [et al.] // *Genes*. – 2019. – Vol. 10, № 8. – Art. № 601.
3. Бактерии *Pseudomonas aurantiaca* БИМ В-446 — основа биопрепарата Экогрин для защиты овощных и зеленных культур от болезней в условиях малообъемной гидропоники / Э. И. Коломиец [и др.] // Микробные биотехнологии: функциональные и прикладные аспекты: сб. науч. тр. / Нац. акад. наук Беларуси [и др.]. – Минск. – 2012. – Т. 4 – С. 98–107.
4. Muratova, A. A. Genome analysis of *Pseudomonas brassicacearum* S-1 — an antagonist of crop pathogens / A. A. Muratova, A. E. Akhremchuk, L. N. Valentovich // *Biotechnol. Acta*. – 2021. – Vol. 14, № 2. – P. 47–58.
5. Molecular genetic analysis of determinants defining synthesis of 2,4-diacetylphloroglucinol by *Pseudomonas brassicacearum* БИМ В-446 bacteria / M. N. Mandryk-Litvinkovich [et al.] // *Appl. Biochemistry a. Microbiol.* – 2017. – Vol. 53, №. 1. – P. 31–39.
6. Муратова, А. А. Анализ влияния *hcn*-кластера генов на антибактериальную и антифунгальную активность бактерий *Pseudomonas brassicacearum* БИМ В-446 / А. А. Муратова, Л. Н. Валентович // Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты: материалы XI междунар. науч. конф., Минск, 3–6 июня 2019 г. / Нац. акад. наук Беларуси [и др.]. – Минск. – 2019. – С. 103–104.
7. Bacterial Iron Transport: Coordination Properties of Pyoverdine PaA, a Peptidic Siderophore of *Pseudomonas aeruginosa* / A.-M. Albrecht-Gary [et al.] // *Inorg. Chem.* – 1994. – Vol. 33, № 26. – P. 6 391–6 402.
8. Siderophore uptake in bacteria and the battle for iron with the host; a bird's eye view / B.C. Chu [et al.] // *Biomaterials Int. J. Role Met. Ions Biol. Biochem. Med.* – 2010. – Vol. 23, № 4. – P. 601–611.
9. The *Pseudomonas fluorescens* Siderophore Pyoverdine Weakens Arabidopsis thaliana Defense in Favor of Growth in Iron-Deficient Conditions / P. Trapet [et al.] // *Plant Physiol.* – 2016. – Vol. 171, № 1. – P. 675–693.
10. Ahmed, E. Siderophores in environmental research: roles and applications / E. Ahmed, S.J.M. Holmström // *Microb. Biotechnol.* – 2014. – Vol. 7, № 3. – C. 196–208.
11. Microbial Antagonism at the Root Level Is Involved in the Suppression of *Fusarium* Wilt by the Combination of Nonpathogenic *Fusarium oxysporum* Fo47 and *Pseudomonas putida* WCS358 / B. J. Duijff [et al.] // *Phytopathology*. – 1999. – Vol. 89, № 11. – P. 1 073–1 079.
12. Microbial siderophores: a mini review / R. Saha [et al.] // *J. Basic Microbiol.* – 2013. – Vol. 53, № 4. – P. 303–317.
13. Молекулярно-генетический анализ генома бактерий *Pseudomonas brassicacearum* БИМ В-446, стимулирующих рост и развитие сельскохозяйственных растений / А. А. Муратова, М. Н. Мандрик-Литвинкович, Л. Н. Валентович, Э. И. Коломиец // Биологическая защита растений — основа стабилизации агроэкосистем: материалы междунар. науч.-практ. конф. «Биологическая защита растений — основа стабилизации агроэкосистем. Становление и перспективы развития органического земледелия в Российской Федерации», 11–13 сент. 2018 г. / Рос. акад. наук [и др.]. – Краснодар, 2018. – Вып. 10. – С. 56–59.
14. Bertani, G. Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli* / G. Bertani // *J. Bacteriol.* – 1951. – Vol. 62, № 3. – P. 293–300.
15. Мейнелл, Д. Экспериментальная микробиология / Д. Мейнелл, Э. Мейнелл. – М.: Мир, 1967. – 320 с.
16. Wongjirathiti, A. Utilisation of local crops as alternative media for fungal growth / A. Wongjirathiti, S. Yottakot // *Pertanika J. Trop. Agric. Sci.* – 2017. – Vol. 40. – P. 295–304.
17. Bullock, W. O. XL1-Blue: a high efficiency plasmid transforming *recA Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection / W. O. Bullock, J. M. Fernandez, J. M. Short // *BioTechniques*. – 1987. – Vol. 5, №. 3. – P. 376–379.
18. Metcalf, W. W. Use of the rep technique for allele replacement to construct new *Escherichia coli* hosts for maintenance of R6K gamma origin plasmids at different copy numbers / W. W. Metcalf, W. Jiang, B. L. Wanner // *Gene*. – 1994. – Vol. 138, № 1/2. – P. 1–7.
19. Lorenzo, V. de. Analysis and construction of stable phenotypes in gram-negative bacteria with Tn5- and Tn10-derived minitransposons / V. de Lorenzo, K. N. Timmis // *Methods Enzymol.* – 1994. – Vol. 235. – P. 386–405.

20. CloneJET PCR Cloning Kit [Electronic resource]. – Mode of access: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/K1231>. – Date of access: 18.02.2021.
21. Yanisch-Perron, C. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors / C. Yanisch-Perron, J. Vieira, J. Messing // *Gene*. – 1985. – Vol. 33, № 1. – P. 103–119.
22. Herrero, M. Transposon vectors containing non-antibiotic resistance selection markers for cloning and stable chromosomal insertion of foreign genes in gram-negative bacteria / M. Herrero, V. de Lorenzo, K.N. Timmis // *J. Bacteriol.* – 1990. – Vol. 172, № 11. – P. 6 557–6 567.
23. Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum* / A. Schäfer [et al.] // *Gene*. – 1994. – Vol. 145, № 1. – P. 69–73.
24. Sambrook, J. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* / J. Sambrook, D. Russell. – Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2000. – 2 344 p.
25. Mini-Tn5 transposon derivatives for insertion mutagenesis, promoter probing, and chromosomal insertion of cloned DNA in gram-negative eubacteria. / V. de Lorenzo [et al.] // *J. Bacteriol.* – 1990. – Vol. 172, № 11. – P. 6 568–6 572.
26. Сэги, Й. Методы почвенной микробиологии / Й. Сэги. – М. Колос, 1983. – 296 с.
27. Расчет t-критерия Стьюдента при сравнении средних величин [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://medstatistic.ru/calculators/averagestudent.html>. – Дата доступа: 30.06.2022.
28. King, E. O. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein / E. O. King, M. K. Ward, D. E. Raney // *J. Lab. Clin. Med.* – 1954. – Vol. 44, № 2. – P. 301–307.
29. antiSMASH 5.0: updates to the secondary metabolite genome mining pipeline / K. Blin [et al.] // *Nucleic Acids Res.* – 2019. – Vol. 47, № W1. – P. W81–W87.
30. Sanger, F. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors / F. Sanger, S. Nicklen, A.R. Coulson // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 1977. – Vol. 74, № 12. – P. 5 463–5 467.
31. Молекулярно-генетический анализ детерминант, определяющих антимикробные свойства бактерий *Pseudomonas brassicacearum* БИМ Б-446 / А. А. Муратова, М. Н. Мандрик-Литвинкович, Т. Л. Носонова, Л. Н. Валентович, Э. И. Коломиец, М. А. Титок // *Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. біял. навук.* – 2016. – № 3. – С. 81–84.
32. Ackerley, D.F. Substrate specificity of the nonribosomal peptide synthetase PvdD from *Pseudomonas aeruginosa* / D. F. Ackerley, T. T. Caradoc-Davies, I. L. Lamont // *J. Bacteriol.* – 2003. – Vol. 185, № 9. – P. 2 848–2 855.

A. A. Muratova¹, O. V. Evdokimova¹, M. N. Mandryk-Litvinkovich¹, L. N. Valentovich^{1,2}, M. A. Titok²

MOLECULAR GENETIC AND FUNCTIONAL ANALYSIS OF GENES INFLUENCING PYOVERDINE SYNTHESIS IN *PSEUDOMONAS BRASSICACEARUM* S-1

¹State Scientific Institution

“Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus”

2 Kupreviča St., 220084 Minsk, Republic of Belarus

e-mail: anya.muratova.93@mail.ru

²Belarusian State University

4 Niezaliežnasci Ave., 220030 Minsk, Republic of Belarus

Molecular genetic and functional analysis allowed the identification and characterization of a number of new genetic determinants affecting the synthesis of pyoverdine by *P. brassicacearum* strain S-1. It was established that inactivation of genes encoding Zn-dependent peptidase (*mtfA*), peptidase of the C39 (*GFU70_09550*) family, transmembrane sensor protein (*bvgS*), heme transporter (*ccmC*), and protein with unknown function (*ydgA*) led to changes in fluorescence, efficacy of pyoverdine synthesis and antimicrobial activity in *P. brassicacearum* strain S-1. A previously undescribed genetic locus that determines the synthesis of pyoverdin was found in the chromosome of the studied bacteria. It was shown that the directed inactivation of this locus led to the complete absence of fluorescence and the production of pyoverdine by *P. brassicacearum* strain S-1, as well as to the loss of the ability to suppress the growth of the phytopathogenic strain *Fusarium oxysporum* BIM F-798.

Keywords: *Pseudomonas brassicacearum*, siderophores, fluorescence, mutagenesis, antagonistic activity.

Дата поступления в редакцию: 05 сентября 2022 г.

Е. А. Хотько, А. Д. Таганович, А. Г. Кадушкин

ИЗУЧЕНИЕ ПОЛИМОРФИЗМОВ RS2234693 ГЕНА *ESR1* И RS731236 ГЕНА *VDR* У ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКОЙ ОБСТРУКТИВНОЙ БОЛЕЗНЬЮ ЛЕГКИХ

Учреждение образования
«Белорусский государственный медицинский университет»
Республика Беларусь, 220083, г. Минск, пр. Дзержинского, 83
e-mail: qwerty.poilk@mail.ru

Исследована частота встречаемости полиморфных вариантов rs2234693 (PvuII, T→C) гена *ESR1* и rs731236 (TaqI, T→C) гена *VDR* у 95 пациентов, страдающих хронической обструктивной болезнью легких (ХОБЛ) и у 95 здоровых людей. Обнаружено статистически значимое увеличение ($p = 0,006$) частоты встречаемости гетерозиготного генотипа rs2234693 в 1 интроне гена *ESR1* в группе пациентов с ХОБЛ по сравнению с группой условно здоровых людей. Гетерозиготный генотип TC rs2234693 ассоциирован с повышенным риском развития хронической обструктивной болезни легких (ОШ = 5,21, 95% ДИ: 1,43–19,0). В отношении полиморфизма rs731236 гена *VDR* не определено статистически значимых отличий в частоте встречаемости того или иного генотипа у пациентов с ХОБЛ и здоровых людей.

Ключевые слова: полиморфизм генов, хроническая обструктивная болезнь легких, рецепторы, эстрогены, кальцитриол.

Введение

Воспаление является ведущим признаком хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ). При этом заболевании наблюдается повышенная экспрессия медиаторов воспаления в результате усиления транскрипции генов [1]. Это связано с тем, что индукция многих генов представляет собой специфический ответ во время воспалительного процесса [2].

Многие факторы транскрипции, такие как AP-1 и NF-κB, являются общими для нескольких типов клеток и играют основную роль в регуляции экспрессии генов провоспалительных белков [3]. Факторы транскрипции также могут напрямую активироваться лигандами, такими как глюкокортикоиды, эстрогены и витамин D [4].

Активная форма витамина D опосредует свое биологическое действие через ядерный рецептор витамина (VDR). В кроветворной системе VDR экспрессируется в различных типах клеток, включая макрофаги, дендритные клетки и активированные Т- и В-лимфоциты. Показано, что *in vitro* кальцитриол приводит к уменьшению пролиферации Т-клеток за счет снижения синтеза провоспалительно-

го IL-2 и IFN-γ [118]. Также наблюдается усиленная выработка противовоспалительного IL-4 Т-хелперами 2 типа [5]. Экспериментальные работы показали, что при инактивации гена *VDR* в крови мышей отмечается увеличение количества медиаторов воспаления [6]. Также отмечено, что в клетках легких пациентов, страдающих ХОБЛ, снижена экспрессия рецептора VDR и его мРНК по сравнению с группой здоровых лиц [7].

Эстрогены, в отличие от кальцитриола, обладают как иммуностимулирующими, так и иммуносупрессивными свойствами [8]. Эстрогеновые стероидные гормоны действуют через свои собственные уникальные рецепторы — ESR1 (ER-α) или ESR2 (ER-β) [8]. Показано, что все рецепторы женских половых стероидных гормонов экспрессируются в легочной ткани [9]. Роль ESR1 заключается в регуляции дифференцировки клеток во время развития, что приводит к нормальному количеству альвеол на единицу площади поверхности легких [10]. Кроме того, было продемонстрировано, что именно ESR1 опосредует противовоспалительный ответ клетки [11]. После активации ESR1 происходит ингибиро-

вание внутриклеточного транспорта NF- κ B, что предотвращает экспрессию воспалительных генов [12].

Изменение количества или структуры ESR1 и VDR может быть обусловлено модификацией структуры генов, которые кодируют образование этих рецепторов. Так, одним из вариантов генетических изменений являются однонуклеотидные замены. Среди большого числа полиморфизмов в структуре гена *ESR1* особый интерес представляет rs2234693. Предполагается, что замена Т (тимина) на С (цитозин) в полиморфном локусе rs2234693 может влиять на связывание с факторами транскрипции семейства *myb* и изменять экспрессию мРНК ESR1 [13]. Среди полиморфных вариантов гена *VDR* на стабильность мРНК влияет замена Т (тимина) на С (цитозин) в локусе rs731236 [14].

Цель данного исследования — изучение связи полиморфных вариантов rs2234693 гена *ESR1* и rs731236 гена *VDR* с хронической обструктивной болезнью легких, а также их распределение в изучаемой группе и в группе сравнения (здоровые люди).

Материалы и методы

В ходе исследования были использованы инструментальные, лабораторные и статистические методы исследования. В работе проанализированы образцы ДНК 95 пациентов, имеющих диагноз ХОБЛ, и 95 здоровых людей.

Всем обследуемым были проведены диагностические тесты для оценки функции внешнего дыхания. Критериями исключения пациентов из основной группы являлись наличие бронхиальной астмы, атопии, аллергического ринита, туберкулеза легких, заболевания соединительной ткани с изменением функции дыхательной системы, онкологических заболеваний, бронхоэктатической болезни и других заболеваний бронхолегочной системы, а также неспособность правильно выполнить дыхательный маневр при тестировании функции внешнего дыхания.

Из числа здоровых обследуемых были исключены пациенты, у которых в ходе спирометрии объем форсированного выдоха за первую секунду маневра (ОФВ₁) был менее 80% и величина отношения этого показателя к форсированной жизненной емкости легких (ОФВ₁/

ФЖЕЛ) составляла менее 70%.

Сбор биологического материала и анкетных данных проводился с соблюдением всех этических норм после подписания опрашиваемыми пациентами формы информированного согласия.

Выделение геномной ДНК из лейкоцитов периферической крови выполнено в лаборатории биохимических методов исследования, структурном подразделении Научно-исследовательской части Белорусского государственного медицинского университета с помощью набора NucleoSpin Blood (MACHERY-NAGEL, Германия) согласно инструкции производителя.

Определение однонуклеотидных замен проводили при помощи ПЦР в реальном времени с использованием коммерческих наборов, которые содержали аллель-специфичные TaqMan-зонды, связанные с двумя различными флуоресцентными красителями (ООО «Тест-Ген», Россия) с помощью детектирующего амплификатора ДТ-322 («ДНК-Технология», РФ). Регистрация аллели производилась на основании появления флуоресценции не позже 32 цикла амплификации последовательно для каждой из пробирок при ее позиционировании относительно оптического блока. Условия для проведения ПЦР согласно рекомендации фирмы изготовителя наборов.

Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета программ Microsoft Excel (Microsoft Corporation, USA) и SPSS версии 23.0 (IBM, USA). Тест на соответствие контрольной выборки равновесию Харди-Вайнберга проводили с использованием метода χ^2 ($\alpha = 0,05$; $df = 1$). При сравнении частот встречаемости полиморфных вариантов в группах пациентов с ХОБЛ и контроля использовался стандартный критерий χ^2 Пирсона; при условии, когда объем выборки не превышал 5 случаев, использовали точный двусторонний критерий Фишера. Связь между генотипами и заболеванием оценивали по отношению шансов (ОШ). ОШ указан с 95-процентным доверительным интервалом (ДИ).

Результаты и обсуждение

Распределение частот генотипов по всем изученным полиморфизмам в группе сравнения и группе пациентов с ХОБЛ соответствовало теоретически ожидаемому равновесно-

му распределению Харди–Вайнберга (для rs2234693 $p = 0,11$ и $p = 0,83$ соответственно, для rs731236 — $p = 0,60$ и $p = 0,81$).

Картина аллельного статуса в точке rs731236 гена *VDR* у здоровых людей ($T = 64,2\%$ и $C = 35,8\%$) оказалась подобна результатам исследования, проведенного среди белорусов шести регионов, в которых частота встречаемости минорной аллели составила от 29,9% до 35,0% [15]. В то же время данные метаанализа, проведенного Jolliffe D. A. и соавт., указывают на то, что среди здоровых людей носители генотипа TC встречаются чаще, чем

среди пациентов с ХОБЛ. Так, количество событий на одного участника в год в контрольной группе составило 2,09, в группе пациентов с ХОБЛ — 1,83, однако полученные данные не имели статистически значимых различий [16]. Аналогичная картина была отмечена и в нашей работе, где доля носителей TC в группе сравнения составила 48,4%, а в группе пациентов, страдающих ХОБЛ — 44,2%. Однако при сравнении частоты носительства генотипов этого полиморфного локуса в контрольной и опытной группах статистически значимых отличий выявлено не было (табл. 1).

Таблица 1

Частота встречаемости генотипов/аллелей в опытной и контрольной группах и оценка риска развития ХОБЛ по полиморфным вариантам генов

Ген/rs	Генотип/ аллель	Частота носительства, % (n)		p	ОШ	95% ДИ
		Пациенты с ХОБЛ, n = 95	Здоровые лица, n = 95			
<i>ESR1</i> rs2234693	TT ¹	41,0 (39)	64,2 (61)	0,006	0,19	0,05–0,70
	TC	45,3 (43)	28,4 (27)		5,21	1,43–19,0
	CC	13,7 (13)	7,4 (7)		0,95	0,02–48,3
	TT/TC ²	86,3 (82)	92,6 (88)	>0,05	0,50	0,19–1,32
	CC	13,7 (13)	7,4 (7)		0,95	0,02–48,3
	TC/CC ³	59,0 (56)	35,8 (34)	0,002	2,58	1,43–4,63
	TT	41,0 (39)	64,2 (61)		0,19	0,05–0,70
	T ⁴	63,7 (121)	78,4 (149)	0,002	0,48	0,31–0,76
	C	36,3 (69)	21,6 (41)		2,07	1,32–3,27
<i>VDR</i> rs731236	TT ¹	43,2 (41)	40,0 (38)	>0,05	1,14	0,64–2,03
	TC	44,2 (42)	48,4 (46)		0,84	0,48–1,49
	CC	12,6 (12)	11,6 (11)		0,64	0,46–2,64
	TT/TC ²	87,4 (83)	88,4 (84)	>0,05	0,91	0,38–2,17
	CC	12,6 (12)	11,6 (11)		0,64	0,46–2,64
	TC/CC ³	56,8 (54)	60,0 (57)	>0,05	0,30	0,49–1,56
	TT	43,2 (41)	40,0 (38)		1,14	0,64–2,03
	T ⁴	65,3 (124)	64,2 (122)	>0,05	1,05	0,69–1,60
	C	34,7 (66)	35,8 (68)		0,96	0,63–1,46

Примечание. ¹ — аддитивная модель наследования; ² — рецессивная модель наследования; ³ — доминантная модель наследования; ⁴ — мультипликативная модель наследования

Полиморфизм TaqI (rs731236) приводит к синонимичной замене изолейцина в 352 кодоне 9-го экзона. Хотя наличие полиморфизма TaqI не изменяет структуру белка VDR, но такая однонуклеотидная замена влияет на стабильность мРНК VDR и трансляцию белков, ответственных за снижение количества VDR [14, 17]. Отмечено, что носительство минорной аллели С полиморфного локуса rs731236 связано с более высокими уровнями экспрессии мРНК VDR [18].

Распространенность различных полиморфных вариантов гена *VDR* имеет расово-этнические различия. Так, встречаемость минорной аллели С полиморфизма TaqI у африканцев составляет 28,5% случаев, у азиатов — 37% случаев, а среди европейцев носителями данного варианта являются 39%. Поскольку VDR широко представлен во многих клетках и тканях организма, в том числе и клетках иммунной системы (моноцитах, лимфоцитах, макрофагах), в последние годы были предприняты многочисленные попытки изучения ассоциации полиморфных вариантов гена *VDR* с развитием остеопороза, псориаза, бронхиальной астмы, туберкулеза легких в различных этнических группах [19].

При анализе частот встречаемости аллелей rs2234693 гена *ESR1* в исследуемых группах было обнаружено преобладание носительства аллели С среди лиц, страдающих ХОБЛ (36,3%), по сравнению со здоровыми людьми (21,6%). Носительство гетерозиготного генотипа ТС среди пациентов с ХОБЛ составило 45,3%, а гомозиготного генотипа СС — 13,7%. До настоящего времени исследований, посвященных изучению полиморфизма rs2234693 гена *ESR1* при ХОБЛ, не проводилось. Однако в литературе имеются сведения, что среди пациентов (русские) с идиопатическими интерстициальными пневмониями и саркоидозом органов дыхания гетерозиготный генотип ТС встречается в 48,1% и 55,0% случаев [20].

Следует отметить, что распространенность полиморфизма rs2234693 гена *ESR1* также имеет выраженные этнические различия. Так, частота встречаемости минорной аллели С среди европейцев составляет 42,3%, среди американцев — 34,9%, а среди африканцев — 57%.

Далее был проанализирован уровень от-

ношения шансов для локуса rs2234693 гена *ESR1* с хронической обструктивной болезнью легких. Полученные данные свидетельствуют о том, что носительство генотипа ТС rs2234693 гена *ESR1* повышает риск развития ХОБЛ (ОШ = 5,21; 95% ДИ: 1,43–19,0; $p = 0,006$). Также показатель ОШ, рассчитанный для генотипа ТТ и соответствующий 95% ДИ, свидетельствует о том, что пациенты с ХОБЛ в 5,26 раза реже являются носителями этого гомозиготного генотипа по сравнению со здоровыми людьми, что указывает на его возможное протективное влияние (ОШ = 0,19; 95% ДИ: 0,05–0,70, $p = 0,006$). Результаты оценки связи генотипов с ХОБЛ также свидетельствуют о том, что генотипы с аллелью С встречаются в 2,58 раза чаще среди пациентов, страдающих ХОБЛ, по сравнению с группой здоровых лиц.

Ген эстрогенового рецептора 1 типа расположен на 6 хромосоме, содержит 8 экзонов и 7 интронов и состоит приблизительно из 140 тыс. пар оснований [21]. В настоящее время известно более 2 200 полиморфизмов *ESR1* [22]. Наиболее широко изучены полиморфизмы длин рестрикционных фрагментов 1-го интрона PvuII (T397C) и XbaI (C351G) и (TA)_n-тандемные повторы (VNTR) в промоторной области гена. В литературе имеются данные о связи этих полиморфизмов с развитием различных заболеваний, таких как рак молочной и предстательной желез, остеопороз, болезнь Альцгеймера и сердечно-сосудистые заболевания [23–27]. Однако полученные результаты довольно противоречивы, а сведения о полиморфном локусе rs2234693 при ХОБЛ вовсе отсутствуют.

Вместе с тем ряд авторов указывает на сопряженность однонуклеотидной замены rs2234693 с развитием других заболеваний легких. Так, установлена статистически значимая связь носительства этого полиморфизма с возникновением немелкоклеточного рака легкого в тайваньской популяции [28]. При этом носительство аллели Т характеризовалось как протективное, препятствующее развитию заболевания. В то же время у женщин, страдающих бронхиальной астмой, обнаружена связь генотипа ТС этого полиморфного локуса со снижением функциональной активности легких [29]. Следует добавить, что полимор-

физм rs2234693 может влиять на экспрессию гена *ESR1* как за счет нарушения связывания с факторами транскрипции, так и немелкоклеточного рака легкого в тайваньской популяции путем усиления альтернативного сплайсинга в процессе созревания соответствующей мРНК [29]. Имеющаяся в литературе информация дает основание полагать, что полиморфный локус rs2234693 причастен к развитию ХОБЛ, а гетерозиготное носительство может быть ассоциировано с повышенной вероятностью заболевания.

Заключение

Таким образом, выявлены достоверные различия частоты встречаемости генотипов полиморфного варианта rs2234693 в 1 интроне гена *ESR1* между группами пациентов с хронической обструктивной болезнью легких и здоровыми людьми. Среди пациентов, страдающих хронической обструктивной болезнью легких, достоверно чаще встречались носители гетерозиготного генотипа ТС (ОШ = 5,21; 95% ДИ: 1,43–19,0; $p = 0,006$). Для подтверждения выявленных ассоциаций необходимы дальнейшие исследования.

Список использованных источников

1. Chung, K. F. Multifaceted mechanisms in COPD: inflammation, immunity, and tissue repair and destruction / K. F. Chung, I. M. Adcock // *European Respiratory Journal*. – 2008. – Vol. 31, № 6. – P. 1 334–1 356.
2. Barnes, P. J. Mechanisms in COPD: differences from asthma / P. J. Barnes // *Chest*. – 2000. – Vol. 117, № 2. – P. 10–14.
3. Gilmore, T. D. Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives / T. D. Gilmore // *Oncogene*. – 2006. – Vol. 25, № 51. – P. 6 680–6 684.
4. Saklatvala, J. The p38 MAP kinase pathway as a therapeutic target in inflammatory disease / J. Saklatvala // *Curr. Opin. Pharmacol.* – 2004. – Vol. 4, № 4. – P. 372–377.
5. The role of vitamin D in pulmonary disease: COPD, asthma, infection, and cancer / C. Herr [et al.] // *Respir. Res.* – 2011. – Vol. 12, № 1. – P. 2–9.
6. Modeling the influence of vitamin D deficiency on cigarette smoke-induced emphysema / M. A. Crane-Godreau [et al.] // *Front. Physiol.* – 2013. – Vol. 4. – P. 132–142.
7. Local expression profiles of vitamin D-related genes in airways of COPD patients / C. Mathysen [et al.] // *Respir. Res.* – 2020. – Vol. 21. – P. 137–147.
8. Walker, S. E. Estrogen and autoimmune disease / S. E. Walker // *Clin. Rev. Allergy Immunol.* – 2011. – Vol. 40, № 1. – P. 60–65.
9. The impact of sex and sex hormones on lung physiology and disease: lessons from animal studies / M. A. Carey [et al.] // *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* – 2007. – Vol. 293, № 2. – P. L272–L278.
10. Massaro, D. Estrogen regulates pulmonary alveolar formation, loss, and regeneration in mice / D. Massaro, G. D. Massaro // *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* – 2004. – Vol. 287, № 6. – P. L1154–L1159.
11. Estrogen receptor-alpha as a drug target candidate for preventing lung inflammation / E. Vegeto [et al.] // *Endocrinology*. – 2010. – Vol. 151, № 1. – P. 174–184.
12. 17beta-estradiol inhibits inflammatory gene expression by controlling NF-kappaB intracellular localization / S. Ghisletti [et al.] // *Mol. Cell. Biol.* – 2005. – Vol. 28, № 8. – P. 2 957–2 968.
13. Frequency of estrogen receptor-1 (*ESR1*) gene Ppolymorphism (PvuII and XbaI) in patients with coronary artery disease / R. A. Mariah [et al.] // *American Journal of Medical and Biological Research*. – 2016. – Vol. 4, № 1. – P. 5–9.
14. Vogel, A. Genetic association of vitamin D receptor polymorphisms with primary biliary cirrhosis and autoimmune hepatitis / A. Vogel, C. P. Strassburg, M. P. Manns // *Hepatology*. – 2002. – Vol. 35. – № 1. – P. 126–131.
15. Особенности распределения частот полиморфных аллелей гена рецептора витамина D в популяциях этнических белорусов / Е. А. Аксенова [и др.] // Молекулярная и прикладная генетика: сб. науч. тр. / Институт генетики и цитологии НАН Беларуси; редкол.: А.В. Кильчевский (гл. ред.) [и др.]. – Т. 21. – Минск: Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, 2016. – С. 71–80.
16. Vitamin D to prevent exacerbations of COPD: systematic review and meta-analysis of individual participant data from randomised controlled trials / D. A. Jolliffe [et al.] // *Txorax*. – 2019. – Vol. 74, № 4. – P. 337–345.
17. Vitamin D receptor gene FokI but not TaqI, ApaI, BsmI polymorphism is associated

- with Hashimoto's thyroiditis: a meta-analysis / X. Wang [et al.] // *Sci. Rep.* – 2017. – Vol. 7. – P. 1–11.
18. Prediction of bone density from vitamin D receptor alleles / N. A. Morrison [et al.] // *Nature.* – 1994. – Vol. 367, № 6 460. – P. 284–287.
19. Association of vitamin D receptor gene polymorphisms and Parkinson's disease in Hungarians. / R. Török [et al.] // *Neurosci. Lett.* – 2013. – Vol. 13, № 551. – P. 70–74.
20. Влияние вариантов генов *AGT*, *TGFBI*, *ESR1* и *VDR* на развитие и течение идиопатических интерстициальных пневмоний и саркоидоза органов дыхания / А. С. Улитина [и др.] // *Пульмонология.* – 2017. – Т. 27. – № 3. – С. 346–357.
21. Association Study of Estrogen Receptor Alpha Gene Polymorphisms with Spontaneous Abortion: Is This a Possible Reason for Unexplained Spontaneous Abortion? [Electronic resource] / N. Anousha [et al.] // *Biomed. Res. Int.* – Mode of access: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3817802/>. – Date of access: 13.09.2019. – doi: 10.1155/2013/256470.
22. Genetic predictors of controlled ovarian hyperstimulation: where do we stand today? / S. Altmae [et al.] // *Hum. Reprod. Update.* – 2011. – Vol. 17, № 6. – P. 813–828.
23. Influence of sex and disease severity on gene expression profiles in individuals with idiopathic pulmonary fibrosis / S. P. McGee [et al.] // *Int. J. Mol. Epidemiol. Genet.* – 2014. – Vol. 5, № 2. – P. 71–86.
24. Diverse Associations between ESR1 Polymorphism and Breast Cancer Development and Progression / S. Ding [et al.] // *Clin. Cancer. Res.* – 2010. – Vol. 16, № 13. – P. 3 473–3 484.
25. ESR1 Gene Polymorphisms and Prostate Cancer Risk: A HuGE Review and Meta-Analysis / Y.-M. Wang [et al.] // *PLoS One* – Mode of access: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3689664/>. – Date of access: 27.06.2020. – doi: 10.1371/journal.pone.0066999.
26. The estrogen receptor 1 gene affects bone mineral density and osteoporosis treatment efficiency in Slovak postmenopausal women / V. Mondockova [et al.] // *BMC Med. Genet.* – 2018. – Vol. 19, № 174. – P. 1–13.
27. Luckhaus, C. Estrogen Receptor 1 gene (ESR1) variants in Alzheimer's disease. Results of a meta-analysis / C. Luckhaus, P. G. Sand // *Aging Clin. Exp. Res.* – 2007. – Vol. 19, № 2. – P. 165–168.
28. ESR1 PvuII (rs2234693 T > C) polymorphism and cancer susceptibility: Evidence from 80 studies / X. Liu [et al.] // *J. Cancer.* – 2018. – Vol. 9, № 16. – P. 2 963–2 972.
29. Evidence of a genetic contribution to lung function decline in asthma / G. H. Koppelman [et al.] // *Journal of Allergy and Clinical Immunology.* – 2011. – Vol. 128, № 3. – P. 479–484.

E. A. Khotko, A. D. Taganovich, A. G. Kadushkin

STUDY OF THE POLYMORPHISMS RS2234693 OF THE *ESR1* GENE AND RS731236 OF THE *VDR* GENE IN PATIENTS WITH CHRONIC OBSTRUCTIVE PULMONARY DISEASE

Educational Institution
"Belarusian State Medical University"
83 Dzerzhinsky Ave., 220083 Minsk, Republic of Belarus
e-mail: qwert.poilk@mail.ru

The frequency of the occurrence of polymorphic variants rs2234693 (PvuII, T→C) of the *ESR1* gene and rs731236 (TaqI, T→C) of the *VDR* gene was investigated in 95 patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and in 95 healthy people. A statistically significant increase ($p = 0.006$) in the frequency of the occurrence of the heterozygous TC genotype rs2234693 in the intron 1 of the *ESR1* gene was found in the group of patients with COPD compared to the group of conditionally healthy people. The heterozygous TC genotype rs2234693 is associated with chronic obstructive pulmonary disease ($OR = 5.21$ $CI = 1.43-19.0$) was established. As for the rs731236 polymorphism of the *VDR* gene, there were no significant differences in the frequency of occurrence of one of the genotypes in patients with COPD and healthy people.

Keywords: gene polymorphism, chronic obstructive pulmonary disease, receptors, estrogens, calcitriol.

Дата поступления в редакцию: 5 сентября 2022 г.

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

ВЫЯВЛЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОГО ДЕФЕКТА ДУПЛИКАЦИЯ РАЗВИТИЯ (DD) В БЕЛОРУССКОЙ ПОПУЛЯЦИИ АБЕРДИН-АНГУССКОГО СКОТА

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

Дупликация развития (DD) — моногенное аутосомно-рецессивное заболевание, обусловленное неполной пенетрантностью и вариабельной экспрессивностью гена *NHLRC2* у абердин-ангусской породы крупного рогатого скота, приводящее к появлению телят с удвоением внутренних органов или конечностей. Согласно литературным данным, частота мутаций, обуславливающих дупликацию развития у абердинов очень высокая (выше 20%). Методом ПЦР-ПДРФ был исследован однонуклеотидный полиморфизм (SNP) g.34618072T > C в гене *NHLRC2*, вызывающий дупликацию развития. Нами проведен скрининг выборки из белорусской популяции абердин-ангусского крупного рогатого скота (n = 170 гол.), который не выявил животных-носителей мутантного аллеля (DDC) как среди исследованных коров, так и среди быков.

Ключевые слова: ДНК-тестирование, генетический дефект, дупликация развития, *NHLRC2*, SNP, КРС, абердин-ангусская порода.

Введение

В Беларуси выращивание и откорм крупного рогатого скота (КРС) на мясо является второй после молочной отраслью животноводства. По породной принадлежности маточное поголовье основного стада мясного скота состоит из пород: абердин-ангусской — 37%, герефордской — 31%, лимузинской — 30% и шаролеизской — 2%. В популяции КРС мясного направления, так же как и у молочного скота, часто встречаются генетические дефекты [1], которые могут нанести серьезный экономический ущерб животноводству. Одним из таких дефектов является полимелия, или дупликация развития (Developmental Duplications, DD) [2].

Дупликация развития (DD) — моногенное аутосомно-рецессивное заболевание, обусловленное неполной пенетрантностью и вариабельной экспрессивностью гена *NHLRC2* у абердин-ангусской породы. Данный генетический дефект приводит к появлению телят с удвоением внутренних органов или конечностей. Во всем мире были зарегистрированы спорадические случаи полимелии как у *Bos taurus*, так и у *Bos indicus*. Данная аномалия развития относится к генетическим дефек-

там II класса, которые не являются летальными, но имеют крайне нежелательные проявления, так как требуют дополнительных затрат на лечение больных животных. Телятам с проявлением DD требуется хирургическое вмешательство, без которого они не могут нормально развиваться и в зависимости от тяжести аномалии, могут умереть в первые месяцы жизни. Первые случаи дефекта не связывали с генетикой, а посчитали результатом срачивания близнецов во время эмбрионального развития. Однако частота встречаемости этого врожденного дефекта у телят ангусской породы была значительно выше вероятности наступления случайного события, что позволило предположить возникновение наследственного дефекта. В результате проведения широкомасштабных исследований выявлено, что это заболевание является следствием генетического дефекта и относится к моногенному рецессивному признаку. Мутантный аллель гена *NHLRC2*, ассоциированный с дефектом DD, передается от животных-носителей данной мутации и идентифицируется у ангусов и других помесных пород, полученных в результате скрещивания животными ангусской породы. Пер-

выми носителями мутантного аллеля считают родившихся в 1977 г. потомков быка US AI sire, Ken Caryl Mr Angus 8017. В Австралии почти все выявленные животные, скрытые носители наследственного дефекта дубликации развития, являются потомками быка US Angus, B/R New Design 036. Спорадические случаи полимелии были зарегистрированы и у других пород, включая *Bos indicus*, но пока неизвестно, являются ли эти случаи результатом одной и той же мутации [3–6].

Генетический дефект дубликация развития у абердин-ангусской породы КРС был картирован на 26 хромосоме (OMIA: 002103-9913) [7]. Причиной DD является однонуклеотидный полиморфизм (SNP) g.34618072T > C в гене *NHLRC2*, содержащем повторы NHL, который приводит к аминокислотной замене валина на аланин в 311 позиции (V311A). Такая аминокислотная замена, вероятно, приводит к образованию функционально неактивного белка, который, по всей видимости, регулирует транскрипцию генов во время нейруляции [8, 9]. Заболевание наследуется по простому рецессивному типу наследования с неполной пенетрантностью (54%), в то время как 46% от ожидаемого числа гомозигот визуально не имеют фенотипических признаков генетического дефекта, но при этом имеют субклинические поражения, характерные для полимелии, и могут проявиться в более позднее время [5, 10]. Дубликация развития является следствием дефекта эмбриональной нейруляции, включающей как черепной, так и спинной дизрафизм (расщепление дужек позвонков). Гомозиготные телята рождаются с дополнительными конечностями (с одной или несколькими), как правило, дублируется передняя нога, прикрепленная вдоль спинной срединной линии. Кроме того, встречается черепно-лицевой дисморфогенез (craniofacial dysmorphogenesis) различной степени тяжести (от нарушений размеров челюсти до черепно-лицевого дублирования), а также могут возникать нарушения механизмов деления клеток соединительных тканей, приводящие к развитию доброкачественных новообразований, таких как зрелые тератомы, липомы, дермоидные кисты. Основными экономическими последствиями этого дефекта являются потери от затруднения отела (высокая смерт-

ностью телят) и стоимость хирургических ампутаций, которые необходимы для последующего нормального развития гомозиготных телят. ДНК-тестирование исследованных животных ангусской породы не выявило значительной части гомозиготных больных телят, что дает основание предполагать их гибель на ранних этапах эмбрионального развития [11], что приводит к экономическим потерям в животноводстве.

В 2013 году анализ базы данных Angus Australia показывал, что более 15% зарегистрированного в настоящее время КРС ангусской породы являлись носителями мутации DD (GeneProb) [5]. Обзор базы данных Американской ассоциации ангусов показал, что в 2017–2018 гг. частота животных-носителей дубликации развития составляла более 20% [10]. В связи с высокой частотой встречаемости в мировой популяции ангусов мутантного аллеля гена *NHLRC2*, обуславливающего генетический дефект дубликация развития, существует риск распространения данной патологии и среди абердин-ангусского скота в Беларуси.

Согласно Положению о порядке проведения молекулярной генетической экспертизы племенной продукции государств — членов Евразийского экономического союза (№ 74 от 02.06.2020 г.), рекомендовано проводить исследование биологического материала животных абердин-ангусской породы на выявление генетически детерминированного заболевания — дубликации развития. Поскольку отсутствуют данные по распространенности генетического дефекта DD в белорусской популяции, то целью нашего исследования является разработка ДНК-технологии выявления мутантного аллеля гена *NHLRC2*, вызывающего дубликацию развития и выявление животных-носителей данного генетического дефекта в белорусской популяции абердин-ангусского скота.

Материалы и методы

В качестве объекта исследования был использован крупный рогатый скот абердин-ангусской породы ($n = 170$ гол.). Материалом для исследования служила ДНК, выделенная из биологического материала: цельной крови, проб ткани (ушной выщип) и спермы. Выделение ДНК проводили набором реагентов «Нуклеосорб» («Праймтех», Беларусь). Количе-

ство выделенной ДНК определяли с помощью флуориметра DeNovix DS 11 FS с использованием набора реагентов для измерения концентрации ДНК DeNovix dsDNA Broad Range Kit (DeNovix, США). Для ДНК-идентификации дупликации развития абердин-ангусского скота были использованы следующие методы:

ПЦР-ПДРФ и секвенирование по Сэнгеру для валидации метода (табл. 1).

ПЦР-ПДРФ (полимеразная цепная реакция — полиморфизм длин рестрикционных фрагментов)

Полимеразную цепную реакцию проводили на приборе C-1000 (Bio-Rad, США). Дизайн

Таблица 1

ДНК-идентификация наследственного заболевания у абердин-ангусского скота

Наследственное заболевание	Ген	Хромосома	Локализация	Тип мутации	Метод
Дупликация развития (DD) (полимерия)	<i>NHLRC2</i>	26	<i>g.34618072</i>	экзон 5 <i>932T>C</i> , (<i>Val311Ala</i>)	ПЦР-ПДРФ/ секвенирование

праймеров для получения специфичных фрагментов гена *NHLRC2* длиной 199 п. н. осуществлялся с помощью программы Primer 3. Анализ нуклеотидной последовательности гена *NHLRC2* проводили с помощью Ensembl в форматах FASTA.

ПЦР в объеме 20 мкл реакционной смеси содержала: 5 × ПЦР буфер (+MgCl₂), по 0,5 мкМ каждого праймера, 0,2 мМ dNTP, 1U ДНК-полимеразы, деионизированную MQ-H₂O и 10 нг геномной ДНК. Полимеразную цепную реакцию проводили по программе: 95 °C — 3 мин; 95 °C — 30 сек, 60 °C — 50 сек, 72 °C — 1 мин (35 циклов). Для анализа рестрикционных фрагментов использовали 1 ед. эндонуклеазы HpyF10VI.

Детекцию продуктов ПЦР проводили в 3% агарозном геле (SeaKem LE Agarose, «Lonsa») с интеркалирующим красителем ZUBR Green-1 («Праймтех», Беларусь), относительно маркера длины ДНК, SM1233 («Thermo scientific», EU) и контрольного образца. Анализ и учет полученных результатов ПЦР фрагментов гена *NHLRC2* осуществляли с помощью системы гель-документирования Quantum ST4 («Vilber lourman», Франция).

Секвенирование по Сэнгеру

Методом прямого секвенирования последовательности ДНК проверена специфичность полученных фрагментов гена *NHLRC2*. ПЦР-продукты контрольных образцов изучаемого локуса гена вырезали из геля и очищали с помощью набора реагентов Silica Bead

DNA Gel Extraction Kit («Thermo scientific», Литва). Для постановки секвенирующей ПЦР использовали Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit. Секвенирующую ПЦР проводили согласно следующим условиям: 96 °C — 1 мин; 25 циклов: 96 °C — 10 сек, 50 °C — 5 сек, 60 °C — 4 мин; 16 °C — 5 мин. ПЦР-продукты после секвенирующей ПЦР очищали от непрореагировавших флуоресцентно-меченых терминаторных нуклеотидов переосаждением этанолом/Na₂ЭДТА. Определение нуклеотидной последовательности ДНК проводили на приборе 3500 Genetic Analyzer («Applied Biosystems», США).

Результаты исследования

С помощью разработанной нами методики была исследована выборка (n = 170 гол.) крупного рогатого скота абердин-ангусской породы 3-х популяций Гомельской (n = 34 гол.), Минской (n = 68 гол.) и Брестской (n = 68 гол.) областей Республики Беларусь. Визуализация результатов ПЦР-ПДРФ анализа с помощью системы гель-документирования представлена на рисунке 1.

Размер полученных ПЦР-фрагментов исследованных образцов оценивали относительно маркера длины ДНК и ПКО (рис. 1). У здоровых животных два нормальных аллеля гена *NHLRC2* (гомозигота) на электрофореграмме визуализируется одна полоса размером 199 п. н. (DDF). У животных-носителей мутации (гетерозигота), на электрофореграмме ви-

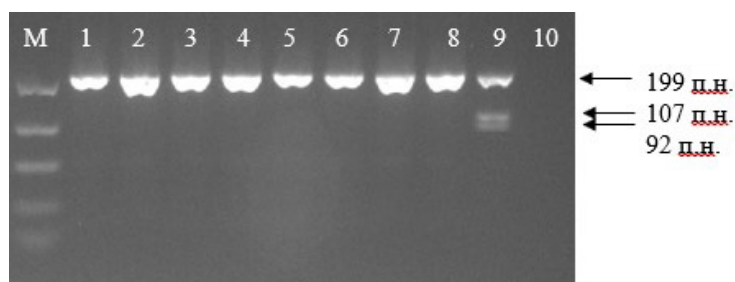


Рис. 1. Электрофореграмма ПЦР-продуктов локуса гена *NHLRC2*: М — маркер длины ДНК, SM1123; 1–8 — здоровые животные (DDF), ПЦР-продукт 199 п. н.; 9 — ПКО — животное-носитель мутации (DDC); 10 — контроль без матрицы (NTC)

зуализируются три полосы 199 п. н., 107 п. н. и 92 п. н. (DDC). Контрольный образец любезно предоставлен сотрудниками Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр животноводства — ВИЖ имени академика Л. К. Эрнста».

Согласно рекомендации American Angus Association, животные с аллелями дикого типа гена *NHLRC2* обозначают DDF (свободные от мутации, здоровые). Животные-носители

мутантного аллеля в гетерозиготе обозначают DDC (носители мутации) и фенотипически ничем не отличаются от животных DDF. Животные-носители мутантных аллелей в гомозиготе, обуславливающих наследственное заболевание дупликацию развития, обозначают DDA [12].

Генотипирование референтных образцов показало полное совпадение результатов, полученных с помощью методов ПЦР-ПДРФ и секвенирования по Сэнгеру (рис. 2).

В исследованной выборке, отобранной из 7

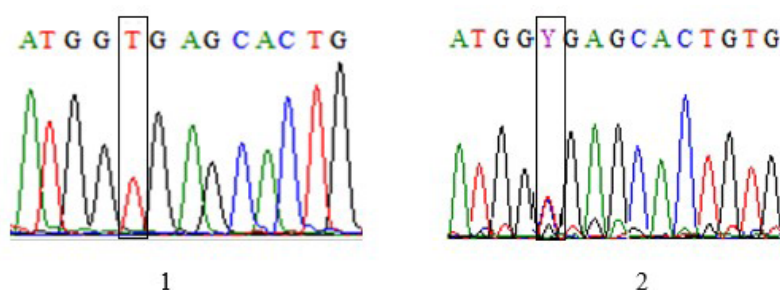


Рис. 2. Результаты секвенирования 1 — гомозиготное здоровое животное (DDF), 2 — животное-носитель мутантного аллеля (DDC) гена *NHLRC2*

хозяйств, республики не выявлено животных, несущих мутантный аллель гена *NHLRC2* как среди быкопроизводящих коров, так и среди быков-производителей (табл. 2).

В исследовании Коноваловой и соавт. (2018 г.) скрининг 10 популяций абердин-ангусов из различных субъектов Российской Федерации ($n = 1\,342$ гол.) выявил 0,9–12,8% животных-носителей мутантного аллеля гена *NHLRC2* [10]. Обзор базы данных Американской ассоциации абердин-ангусской породы показал, что из выборки ($n = 4\,645$ гол.) в 2017 году частота встречаемости животных-носителей DD составила более 20,4% [13]. В 2019 году исследование 2 585 голов КРС абердин-ангусской породы, в том числе 2 244 быков, 341

коровы, выявило животных-носителей DD, во всех исследованных группах с частотой 0,7–38,2% [14].

По литературным данным показана высокая частота встречаемости животных-носителей мутантного аллеля исследуемого локуса гена *NHLRC2* в популяциях ангусов в разных странах [3–14]. Генотипирование КРС абердин-ангусской породы в Республике Беларусь не проводилось и, соответственно, отсутствовали данные по распространению генетического дефекта DD в белорусской популяции. С использованием разработанной ДНК-технологии выявления мутантного аллеля гена *NHLRC2*, детерминирующего дупликацию развития, было протестировано 170 голов КРС

Таблица 2

Результаты ДНК-тестирования выборки из популяции абердин-ангусского крупного рогатого скота (n=170 гол.) для выявления животных-носителей мутантного аллеля гена *NHLRC2*, вызывающего дубликацию развития (DD)

Область	Хозяйство	Кол-во протестированных жив., гол.			Частота свободных от мутации здоровых животных (DDF), %			Частота животных-носителей мутантного аллеля (DDC), %		
		Всего	Быков	Коров	Всего	Быков	Коров	Всего	Быков	Коров
Гомельская	Агро-Лясовичи	31	15	16	100	100	100	–	–	–
	Гомельгосплемпредприятие	3	3	–	100	100	–	–	–	–
Минская	Трайпл-Агро	7	–	7	100	–	100	–	–	–
	КФХ «Весна-агро»	61	34	27	100	100	100	–	–	–
Брестская	Молодово-Агро	33	–	33	100	–	100	–	–	–
	Агро-Мотоль	24	–	24	100	–	100	–	–	–
	Брестплемпредприятие	11	11	–	100	100	–	–	–	–

из 7 сельскохозяйственных предприятий республики. В исследуемой популяции животных-носителей мутантного аллеля (DDC) выявлено не было. Для получения более полных данных о наличии и распространении генетического дефекта DD в поголовье абердин-ангусского скота белорусской селекции исследования будут продолжены на более широкой выборке животных.

Заключение

Внедрение методов ДНК-диагностики в практику животноводства позволяет повышать экономическую эффективность отрасли за счет понижения эмбриональной смертности телят путем исключения животных-носителей рецессивных наследственных аномалий из популяций сельскохозяйственных животных.

Разработанная нами методика выявления мутантного аллеля гена *NHLRC2*, вызывающе-

го дубликацию развития, позволила провести исследование выборки из белорусской популяции абердин-ангусского скота из трех областей Республики Беларусь. Животных носителей мутантного аллеля моногенного аутосомно-рецессивного заболевания дубликации развития в исследованной выборке из белорусской популяции ангусского скота не выявлено. В дальнейшем будет продолжено ДНК-типирование абердин-ангусского крупного рогатого скота для получения полных данных о распространении генетического дефекта дубликации развития данного поголовья. Учитывая повсеместное использование искусственного осеменения спермой лучших быков-производителей и высокую частоту данного генетического дефекта, которая в разных странах варьирует от 0,7 до 38,2%, существует вероятность распространения дубликации развития в белорусской популяции. Разработанная ме-

тодика позволяет проводить молекулярно-генетическую экспертизу племенной продукции (животные, эмбрионы, сперма) в Республике Беларусь, в порядке установленном международно-правовыми актами, составляющими право Евразийского экономического союза, с целью предупреждения распространения дубликации развития среди племенных животных абердин-ангусской породы КРС.

Работа выполнена при финансовой поддержке ГП «Наукоемкие технологии и техника» на 2016–2020 годы, подпрограммы 1 «Инновационные биотехнологии–2020», мероприятие 2ИБ «Разработать ДНК-технологии идентификации полиморфных вариантов генов, влияющих на репродуктивные признаки, с целью повышения воспроизводительной способности КРС мясного направления».

Список использованных источников

1. Романишко, Е. Л., Михайлова, М. Е., Киреева, А. И. Выявление гаплотипов фертильности в белорусской популяции крупного рогатого скота голштинской породы / Е. Л. Романишко, М. Е. Михайлова, А. И. Киреева, Р. И. Шейко // Молекулярная и прикладная генетика. – 2021. – Т. 31. – С. 7–21.
2. Beever, J. E., Marron, B. M., Parnell P. F. Developmental Duplications (DD): 1. Elucidation of the underlying molecular genetic basis of polymelia phenotypes in Angus cattle // J. E. Beever, B. M. Marron, et all // P. F. Parnell. Proc. XXVIII World Buiatrics Congress, Cairns Australia. – 2014.
3. Denholm, L. J., Martin, L. E. Polymelia (supernumerary limbs) in Angus calves Flock and Herd case notes. – 2011. Электронный ресурс: <http://www.flockandherd.net.au/cattle/reader/polymelia.html>
4. A number of different congenital anomalies are known to occur in domestic cattle / M. R. Alam, J. I. Lee, H. B. Lee, et all. // Veterinarni Medicina. – 2007. – № 52 (5). – P. 202–206.
5. Denholm, L. J., Martin, L. E. Developmental duplications in Angus calves Flock and Herd case notes. – 2013. Электронный ресурс: <http://www.flockandherd.net.au/cattle/reader/developmental-duplication-angus.html>
6. McClure M. Genetic Disease and Trait Information for IDB / M. McClure, J. McClure // Genotyped Animals in Ireland. – 2016. – 43 p.
7. Электронный ресурс: <https://omia.org/OMIA002103/9913/>
8. Denholm, L. J., Martin, L. E., Teseling, C. F., Parnell, P. F., Beever, J. E. Developmental Duplications (DD): 2. Mutation of the *NHLRC2* gene causes neural tube defects in Angus cattle with multiple congenital malformation phenotypes that include axial and limb duplications, heteropagus conjoined twins, midbrain and forebrain malformations including pseudoholoprosencephalon, craniofacial dysmorphogenesis, microphthalmia, diprosopus, embryogenic teratomas, dermoid cysts, myolipomas, split cord malformation and cranial and spinal dysraphism. // Proc. XXVIII World Buiatrics Congress, Cairns Australia. – 2014. – Abstract 0100.
9. DNA analysis of the Russian populations of Aberdeen Angus, Hereford and Belgian Blue cattle / L. N. Konovalova, O. S. Romanenkova, V. V. Volkova et all. // Archives Animal Breeding. – 2020. – № 63(2). – P. 409–416.
10. Коновалова, Е. Н. ДНК-диагностика генетического дефекта дубликации (DD) у крупного рогатого скота абердин-ангусской породы / Е. Н. Коновалова, О. В. Костюнина // Молочное и мясное скотоводство. – 2018. – № 4. – С. 20–24.
11. Тестирование на носительство наследственных заболеваний крупного рогатого скота абердин-ангусской породы // Министерство сельского хозяйства Российской Федерации Россельхознадзор Федеральное Государственное бюджетное учреждение «Всероссийский Государственный Центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов» (ФГБУ «ВГНКИ») Электронный ресурс: <https://www.vgnki.ru/assets/files/broshyura-o-testah-aberdin-angusskoj-porody.pdf>
12. Электронный ресурс: <https://www.angus.org>
13. Konovalova E. N. Genetic defects of beef cattle and necessity of their managing // RJOAS. – 2017. – № 8(68). – P. 254–259.
14. Коновалова Е. Н., Костюнина О. В. Распространение генетических дефектов множественного артрогрипоза (АМ) и дубликации развития (DD) среди российских популяций крупного рогатого скота абердин-ангусской породы. Генетика и разведение животных. 2019. – № 1. – С. 16–21.

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

IDENTIFICATION OF THE GENETIC DEFECT OF DEVELOPMENTAL DUPLICATION (DD) IN THE BELARUSIAN POPULATION OF ABERDEEN ANGUS CATTLE

State Scientific Institution

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

27 Akademicheskaya St., 220072 Minsk, Republic of Belarus

e-mail: lenaramanishko@mail.ru

Developmental duplication (DD) is a monogenic autosomal recessive disease with incomplete penetrance and variable expressivity of Aberdeen Angus cattle, resulting in calves with twice the number of various organs and limbs of the animal. According to the literature, the frequency of mutations that cause developmental duplications in Aberdeen is high (above 20%). Single nucleotide polymorphism (SNP) g.34618072T > C in the *NHLRC2* gene, which causes developmental duplication, was studied by PCR-RFLP. We screened a sample from the Belarusian population of Aberdeen-Angus cattle (n = 170 heads), which did not reveal animals carrying the mutant allele (DDC) both among the studied cows and among bulls.

Keywords: DNA testing, genetic defect, duplication developmental, *NHLRC2*, SNP, cattle, Aberdeen Angus.

Дата поступления в редакцию: 02 сентября 2022 г.

А. Н. Михалюк, Л. А. Танана

АССОЦИАЦИЯ КОМПЛЕКСА ПОЛИМОРФНЫХ ВАРИАНТОВ ГЕНОВ *DGATI*, *GH*, *PRL* И *BLG* С ПОКАЗАТЕЛЯМИ МОЛОЧНОЙ ПРОДУКТИВНОСТИ КОРОВ КРАСНОЙ БЕЛОРУССКОЙ ПОРОДНОЙ ГРУППЫ

Учреждение образования
«Гродненский государственный аграрный университет»
Республика Беларусь, 230008, г. Гродно, ул. Терешковой, 28
e-mail: alex-vet@mail.ru

При оценке ассоциированного влияния комплекса полиморфных вариантов генов диацилглицерол О-ацил трансферазы 1 (*DGATI*), соматотропина (*GH*), пролактина (*PRL*) и бета-лактоглобулина (*BLG*) с показателями молочной продуктивности коров красной белорусской породной группы установлено, что наиболее высокие показатели молочной продуктивности имели животные с комплексным генотипом *DGATI^{KK} GH^{LL} PRL^{AA} BLG^{AB}*.

Ключевые слова: крупный рогатый скот, комплексные генотипы, гены диацилглицерол О-ацил трансферазы 1 (*DGATI*), соматотропина (*GH*), пролактина (*PRL*) и бета-лактоглобулина (*BLG*), молочная продуктивность.

Введение

Для повышения эффективности селекционно-племенной работы, направленной на повышение и совершенствование наиболее важных хозяйственно-полезных признаков, рекомендуется маркировать один и тот же признак по нескольким генам. Комплексное маркирование позволяет более эффективно проводить селекционную работу, что способствует повышению уровня молочной продуктивности крупного рогатого скота [1, 2]. Вместе с тем во многих доступных нам научных работах комплексное влияние генов на хозяйственно-полезные признаки крупного рогатого скота не рассматривалось. Предполагается, что небольшое количество коров с редкими генотипами в стаде не позволяет делать категоричные выводы о взаимосвязи генотипов с показателями молочной продуктивности, что предполагает проведение дальнейших исследований [3, 4]. В качестве перспективных генов-маркеров продуктивности коров выделяют гены диацилглицерол О-ацил трансферазы 1 (*DGATI*), *GH* (гормона роста), *PRL* (пролактина), *LGB* (лактоглобулина), *BoLA DRB 3*, *CSN3* (капа-казеина) и другие. Их взаимосвязь с хозяйственно-полезными признаками продуктивности животных в той или иной степени изучены, однако вопрос об их комплексном влиянии на

количественные и качественные показатели молочной продуктивности остается открытым.

Целью данной работы было исследование полиморфизма генов и оценка ассоциированного влияния комплексных генотипов генов диацилглицерол О-ацил трансферазы 1 (*DGATI*), соматотропина (*GH*), пролактина (*PRL*), бета-лактоглобулина (*BLG*) с показателями молочной продуктивности коров красной белорусской породной группы. Оценка ассоциированного влияния комбинации генотипов исследуемых генов проводилась по трем лактациям коров.

Материалы и методы

Для исследования использовали биологический материал (ушной выщип) коров красной белорусской породной группы в количестве 104. Для оценки аллелофонда коров красной белорусской породной группы служили данные по продуктивности, полученные из УСП «Новый Двор-Агро» Свислочского района Гродненской области.

ДНК-генотипирование животных по генам диацилглицерол О-ацил трансферазы 1 (*DGATI*), соматотропина (*GH*), пролактина (*PRL*) и бета-лактоглобулина (*BLG*) проводили с использованием метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) и полиморфизма длин

рестрикционных фрагментов (ПДРФ). Ядерную ДНК выделяли перхлоратным методом. Основные растворы для выделения ДНК готовили по Т. Маниатису, Э. Фрич, Дж. Сэмбруку [5], а для амплификации и рестрикции использовали растворы производства ОДО

«Праймтех», Беларусь.

В таблице 1 приведен состав реакционной смеси для проведения амплификации исследуемых локусов генов диацилглицерол О-ацил трансферазы 1 (*DGAT1*), соматотропина (*GH*), пролактина (*PRL*) и бета-лактоглобулина (*BLG*).

Таблица 1

Состав реакционной смеси для проведения амплификации исследуемых локусов генов *DGAT1*, *GH*, *PRL* и *BLG*

Компоненты	Количество реагентов на 1 пробу
1 × Taq-буфер	1 ×
50 мМ MgCl ₂	2–5 мМ
Смесь дНТФ	2–4 мМ
Праймер 1	10–25 пМ
Праймер 2	10–25 пМ
Taq-полимераза 2 500 ед, Евроген, РК113L	0,5–1,5 е. а.
ДНК	200–250 нг/мкл
H ₂ O	доводим до 25 мкл

Для амплификации участка гена *DGAT1* использовали праймеры [6]:

DGAT1 1: 5' CAC CAT CCT CTT CCT CAA GC 3';

DGAT1 2: 5' ATG CGG GAG TAG TCC ATG TC 3'.

Условия проведения ПЦР *DGAT1*: 94 °C — 5 мин; 30 циклов: 94 °C — 30 сек; 59 °C — 40 сек; 72 °C — 40 сек; достройка или финальная элонгация: 72 °C — 7 мин. Наличие ПЦР-фрагмента оценивали электрофоретическим методом в 2% агарозном геле при напряжении 120 В, 50–60 мин. Длина амплифицированного фрагмента гена *DGAT1* составила 411 п. н. Для рестрикции амплифицированного локуса гена *DGAT1* применяли эндонуклеазу Aco I. Реакцию проводили при температуре 37 °C. Продукты рестрикции генов разделяли электрофоретически в 3% агарозном геле при напряжении 130 В, 50–60 мин, в 1 × TBE буфере. Визуализацию фрагментов проводили при УФ-свете на системе геледокументирования Gel Doc RX + (BIORAD) с использованием бромистого этидия. При расщеплении продуктов амплификации гена *DGAT1* идентифицировался генотип: *DGAT1*^{KK} — фрагмент 411 п. н. (рис. 1).

Для амплификации участка гена *GH* исполь-

зовали праймеры [7]:

GH 1: 5' CCG TGT CTA TGA GAA GC 3';

GH 2: 5' GTT CTT GAG CAG CGC GT 3'.

Условия проведения ПЦР *GH*: 94 °C — 4 мин; 35 циклов: 94 °C — 45 сек; 65 °C — 45 сек; 72 °C — 45 сек; достройка или финальная элонгация: 72 °C — 7 мин. Наличие ПЦР-фрагмента оценивали электрофоретическим методом в 2% агарозном геле при напряжении 120 В, 50–60 мин. Длина амплифицированного фрагмента гена *GH* составила 223 п. н. Для рестрикции амплифицированного участка гена *GH* применяли эндонуклеазу AluI. Реакцию проводили при температуре 37 °C. Продукты рестрикции генов разделяли электрофорети-

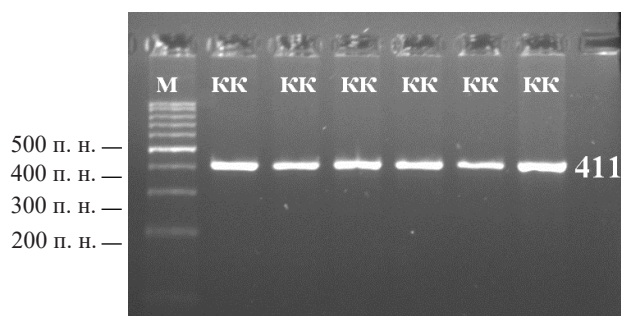


Рис. 1. Электрофореграмма рестрикционного анализа гена *DGAT1*: М — маркер молекулярного веса 200–500 п. н. (ОДО «Праймтех», Беларусь)

чески в 3% агарозном геле при напряжении 130 В, 50–60 мин, в 1 × TBE буфере. Визуализацию фрагментов проводили при УФ-свете на системе геледокументирования Gel Doc RX + (BIORAD) с использованием бромистого этидия. При расщеплении продуктов амплификации по гену *GH* идентифицировались генотипы: GH^{LL} — 208 п. н.; GH^{LV} — 208/172/35 п. н.; GH^{VV} — 172/35 п. н. (рис. 2).

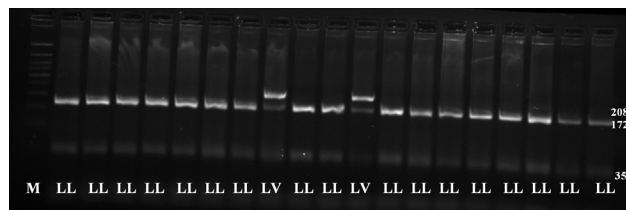


Рис. 2. Электрофореграмма рестрикционного анализа гена *GH*

Для амплификации участка гена *BLG* использовали праймеры [8]:

BLG 1: 5' TGT GCT GGA CAC CGA CTA CAA AAA G 3';

BLG 2: 5' GCT CCC GGT ATA TGA CCA CCC TCT 3'.

Условия проведения ПЦР *BLG*: 94 °C — 5 мин; 30 циклов: 94 °C — 30 сек; 59 °C — 40 сек; 72 °C — 20 сек; элонгация: 72 °C — 3 мин. Наличие ПЦР-фрагмента оценивали электрофоретическим методом в 2% агарозном геле при напряжении 120 В, 50–60 мин. Длина фрагмента гена *BLG* — 247 п. н. Для рестрикции амплифицированного участка гена *BLG* применяли эндонуклеазу BsuRI (Hae III). Реакцию проводили при температуре 37 °C.

Продукты рестрикции генов разделяли электрофоретически в 3% агарозном геле при напряжении 130 В, 50–60 мин, в 1 × TBE буфере. Визуализацию фрагментов проводили при УФ-свете на системе геледокументирования Gel Doc RX + (BIORAD) с использованием бромистого этидия. При расщеплении продуктов амплификации по гену *BLG* идентифицируются следующие генотипы: BLG^{AA} — фрагменты 148/99 п. н.; BLG^{AB} — фрагменты 148/99/74 п. н.; BLG^{BB} — фрагменты 99/74 п. н. (рис. 3).

Для амплификации участка гена *PRL* использовали праймеры [9]:

PRL 1: 5' CGA GTC CTT ATG AGC TTG ATT CTT 3';

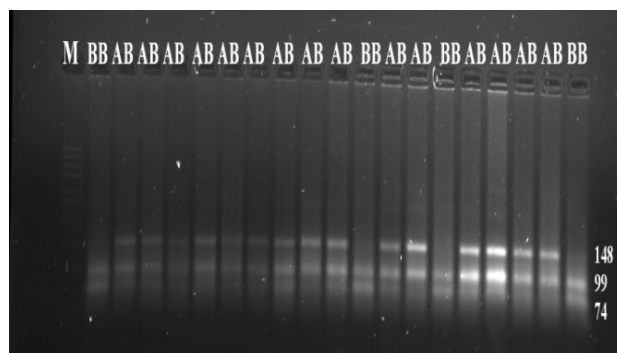


Рис. 3. Электрофореграмма рестрикционного анализа гена *BLG*

PRL 2: 5' GCC TTC CAG AAG TCG TTT GTT TTC 3.

Условия проведения ПЦР *PRL*: 94 °C — 4 мин; 35 циклов: 94 °C — 45 сек; 65 °C — 45 сек; 72 °C — 45 сек; элонгация: 72 °C — 7 мин. Наличие ПЦР-фрагмента оценивали электрофоретическим методом в 2% агарозном геле при напряжении 120 В, 50–60 мин. Длина амплифицированного фрагмента гена *PRL* — 156 п. н. Для рестрикции амплифицированного участка гена *PRL* применяли эндонуклеазу Rsa I. Реакцию проводили при температуре 37 °C. Продукты рестрикции генов разделяли электрофоретически в 3% агарозном геле при напряжении 130 В, 50–60 мин, в 1 × TBE буфере. Визуализацию фрагментов проводили при УФ-свете на системе геледокументирования Gel Doc RX + (BIORAD) с использованием бромистого этидия. При расщеплении продуктов амплификации по гену *PRL* идентифицируются следующие генотипы: PRL^{AA} длиной 156 п. н.; PRL^{AB} — 156/82/74 п. н.; PRL^{BB} — 82/74 п. н. (рис. 4).

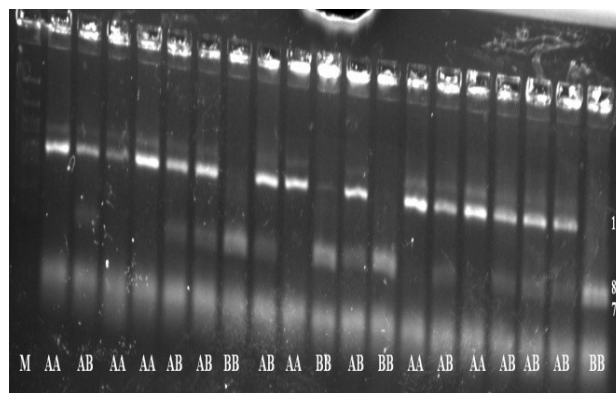


Рис. 4. Электрофореграмма рестрикционного анализа гена *PRL*

Частота встречаемости аллелей по генам диацилглицерол О-ацил трансферазы 1 (*DGATI*), пролактина (*PRL*), бета-лактоглобулина (*BLG*) и соматотропина (*GH*) рассчитана по формулам по Е. К. Меркурьевой [10]. Для оценки генетического равновесия в популяции по изучаемым генам определяли критерий хи-квадрат (χ^2) или критерий Пирсона [11].

Для изучения молочной продуктивности подопытные животные красной белорусской породной группы были сгруппированы в зависимости от возраста: первотелки, коровы второго и третьего отелов. Молочную продуктивность коров определяли по результатам контрольных доений. В статистическую обработку включали показатели животных, продолжительность лактации у которых была не менее 240 дней. У животных с различными генотипами по изучаемым генам учитывали удой, массовую долю жира и белка, выход молочного жира и белка за 305 дней лактации или укороченную лактацию.

Селекционно-генетические параметры основных хозяйственно-полезных признаков определяли методами биологической статистики в описании Н. А. Плохинского [12], используя при этом компьютерную программу Microsoft Excel.

Результаты и обсуждение

Характеристика генофонда крупного рога-

того скота по полиморфизму генов, связанных с показателями молочной продуктивности животных, крайне важна для создания стад с более высокими качественными показателями молока.

В таблице 2 представлена генетическая структура коров красной белорусской породной группы по генам диацилглицерол О-ацил трансферазы 1 (*DGATI*), соматотропина (*GH*), пролактина (*PRL*) и бета-лактоглобулина (*BLG*).

Ген *DGATI* локализован на 14 хромосоме генома *Bostaurus* и определен как генетический маркер, влияющий на качество молока. Белок DGAT1 используется в биосинтезе липидов и связан с жирномолочностью коров [13]. Установлено (GrisartB., 2002), что генотип *DGATI^{KK}* является наиболее желательным, т. к. коровы, имеющие данный генотип производят более жирное молоко, чем коровы с генотипами *DGATI^{AK}* и *DGATI^{AA}* [14]. В результате проведенных нами исследований установлено, что у коров красной белорусской породной группы выявлен лишь один генотип — *DGATI^{KK}*, т. е. исследованная выборка коров по гену *DGATI* была мономорфная, частота аллеля К = 1. Полученные данные свидетельствуют о том, что стадо хорошо отселекционировано и все животные имеют желательный по показателю жирномолочности генотип — *DGATI^{KK}*.

Установлен полиморфизм гена соматотропина (*GH*), представленный двумя аллеля-

Таблица 2

Генетическая структура коров красной белорусской породной группы генов *GH*, *DGATI*, *PRL* и *BLG* (n = 104)

Ген	Частота встречаемости								Критерий χ^2
	фактическая					ожидаемая			
	аллелей		генотипов, %			генотипов, %			
<i>DGAT1</i>	A	K	KK	AK	AA	KK	AK	AA	—
	—	1,0	100,0	—	—	100,00	—	—	
<i>GH</i>	L	V	LL	LV	VV	LL	LV	VV	0,1784
	0,813	0,187	66,0	32,0	2,0	66,0	30,0	4,0	
<i>PRL</i>	A	B	AA	AB	BB	AA	AB	BB	2,3142
	0,870	0,130	74,0	26,0	—	76,0	22,0	2,0	
<i>BLG</i>	A	B	AA	AB	BB	AA	AB	BB	9,2470
	0,543	0,457	22,0	65,0	13,0	29,0	50,0	21,0	

ми — GH^L и GH^V , при этом идентифицировано три генотипа GH^{LL} , GH^{LV} и GH^{VV} . Среди опытных животных чаще встречались особи с генотипами GH^{LL} — 66%, GH^{LV} — 32%, а GH^{VV} — 2% коров.

По результатам исследований установлен полиморфизм гена пролактина (PRL), представленный двумя аллелями — PRL^A и PRL^B , при этом идентифицировано два генотипа: PRL^{AA} и PRL^{AB} . Среди опытных животных чаще встречались особи с генотипом PRL^{AA} — 74%, с генотипом PRL^{AB} — 26%. Что касается гена бета-лактоглобулина (BLG), то также установлен его полиморфизм. Он представлен двумя аллелями — BLG^A и BLG^B , при этом было идентифицировано три генотипа: два гомозиготных — AA и BB и гетерозиготный — AB . Частота встречаемости особей с генотипом BLG^{AB} — 65%, с генотипом BLG^{AA} — 22%, а с генотипом BLG^{BB} — 13%. В таблице 2 представлена ожидаемая (теоретическая) частота встречаемости генотипов по гену бета-лактоглобулина (BLG). Сравнив полученные результаты, можно отметить значительные отклонения между фактической и ожидаемой частотой встречаемости генотипов. Анализ критерия хи-квадрат (χ^2) свидетельствует о том, что по гену соматотропина (GH) и пролактина (PRL) генетическое равновесие не нарушено, а частота встречаемости генотипов фактическая практически соответствует ожидаемой. Что

касается гена бета-лактоглобулина (BLG), то полученные данные свидетельствуют о нарушении генетического равновесия, что может указывать на давление искусственного отбора, т. е. на жесткую селекцию, направленную на увеличение молочной продуктивности (обильномолочности).

Анализ данных рисунка 5 свидетельствует, что из всех протестированных первотелок наибольшее количество животных имело генотип $DGAT1^{KK} GH^{LL} PRL^{AA} BLG^{AB}$ — 23,3% (17 голов). Всего было выявлено 12 комплексных генотипов из 18 возможных комбинаций. Так, 13,7% первотелок, или 10 голов, имели генотип $DGAT1^{KK} GH^{LV} PRL^{AA} BLG^{AB}$; 12,3%, или 9 голов, имели генотип $DGAT1^{KK} GH^{LL} PRL^{AA} BLG^{AA}$; у 10,9% животных, или 8 голов, был выявлен генотип $DGAT1^{KK} GH^{LL} PRL^{AB} BLG^{AB}$; по 6 голов, или по 8,2% первотелок, имели генотипы $DGAT1^{KK} GH^{LL} PRL^{AB} BLG^{AA}$ и $DGAT1^{KK} GH^{LV} PRL^{AB} BLG^{AB}$ соответственно; по 5 голов, или по 6,8% животных, имели генотипы $DGAT1^{KK} GH^{LV} PRL^{AA} BLG^{AA}$ и $DGAT1^{KK} GH^{LV} PRL^{AA} BLG^{BB}$; 3 головы, или 4,1% первотелок, имели генотип $DGAT1^{KK} GH^{LL} PRL^{AA} BLG^{BB}$; у 2,7% голов животных был генотип $DGAT1^{KK} GH^{LV} PRL^{AB} BLG^{BB}$ и генотипы $DGAT1^{KK} GH^{LV} PRL^{AB} BLG^{AA}$ и $DGAT1^{KK} GH^{VV} PRL^{AA} BLG^{AB}$ имели по 1 животному.

Данные, представленные на рисунке 6, свидетельствуют, что так же, как и в случае с перво-

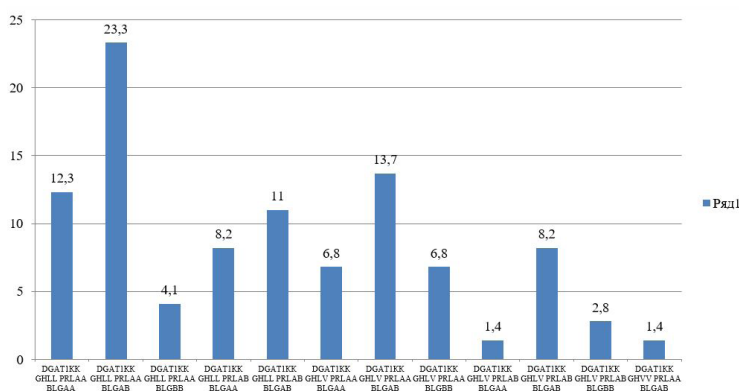


Рис. 5. Соотношение первотелок красной белорусской породной группы с выявленными комбинациями генотипов генов диацилглицерол О-ацил трансферазы 1 ($DGAT1$), соматотропина (GH), пролактина (PRL) и бета-лактоглобулина (BLG)

телками, наибольшее количество из всех протестированных животных последующих лактаций имели генотип $DGAT1^{KK} GH^{LL} PRL^{AA} BLG^{AB}$ — 25,0% (12 голов). Всего же было выявлено 11 ге-

нотипов из 18 возможных комбинаций. При этом другие комплексные генотипы были распределены следующим образом: 12,5% коров, или 6 голов, имели генотип $DGAT1^{KK} GH^{LV} PRL^{AA} BLG^{BB}$;

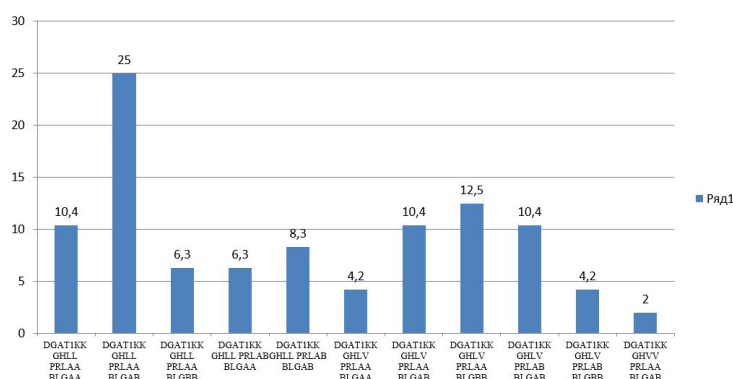


Рис. 6. Соотношение коров красной белорусской породной группы второй лактации с выявленными комбинациями генотипов генов диацилглицерол О-ацил трансферазы 1 (*DGAT1*), соматотропина (*GH*), пролактина (*PRL*), бета-лактоглобулина (*BLG*)

5 животных (10,4%) имели генотипы *DGAT1*^{KK} *GH*^{LL} *PRL*^{AA} *BLG*^{AA}, *DGAT1*^{KK} *GH*^{LV} *PRL*^{AA} *BLG*^{AB}, *DGAT1*^{KK} *GH*^{LV} *PRL*^{AB} *BLG*^{AB} соответственно; 4 головы (8,3%) имели генотип *DGAT1*^{KK} *GH*^{LL} *PRL*^{AB} *BLG*^{AB}; по 6,3%, или по 3 животных, имели генотипы *DGAT1*^{KK} *GH*^{LL} *PRL*^{AA} *BLG*^{BB} и *DGAT1*^{KK} *GH*^{LL} *PRL*^{AB} *BLG*^{AA}; по 2 головы (4,2%) имели генотипы *DGAT1*^{KK} *GH*^{LV} *PRL*^{AA} *BLG*^{AA} и *DGAT1*^{KK} *GH*^{LV} *PRL*^{AB} *BLG*^{BB}; у 1 животного был выявлен генотип *DGAT1*^{KK} *GH*^{VV} *PRL*^{AA} *BLG*^{AB}.

Анализ данных показал, что также как и в двух предыдущих случаях наибольшее количество из всех протестированных коров имели генотип *DGAT1*^{KK} *GH*^{LL} *PRL*^{AA} *BLG*^{AB} — 27,3% (9 голов). Общее количество выявленных генотипов — 10, в том числе 15,1%, или 5 голов, имели генотип *DGAT1*^{KK} *GH*^{LV} *PRL*^{AA} *BLG*^{AB}; по 4 головы, или по 12,1%, имели генотипы *DGAT1*^{KK} *GH*^{LV} *PRL*^{AA} *BLG*^{BB} и *DGAT1*^{KK} *GH*^{LV} *PRL*^{AB} *BLG*^{AB}; у 9,1%, или у 3 животных, был выявлен генотип *DGAT1*^{KK} *GH*^{LL} *PRL*^{AA} *BLG*^{AA}; по 2 головы, или по 6,1% животных, имели генотипы *DGAT1*^{KK} *GH*^{LL} *PRL*^{AA} *BLG*^{BB},

DGAT1^{KK} *GH*^{LL} *PRL*^{AB} *BLG*^{AA}, *DGAT1*^{KK} *GH*^{LL} *PRL*^{AB} *BLG*^{AB}; по 1 животному, или по 3,0%, имели генотипы *DGAT1*^{KK} *GH*^{LV} *PRL*^{AB} *BLG*^{BB} и *DGAT1*^{KK} *GH*^{VV} *PRL*^{AA} *BLG*^{AB} (рис. 7).

Следует отметить, что к третьей лактации почти половина протестированных животных из числа первотелок выбыла из основного стада. Причинами выбытия явились: маститы (62%), эндометриты (19%), болезни конечностей (11%), другие причины (8%).

Анализ данных, представленных в таблице 3, свидетельствует, что наиболее высокий удой был у первотелок красной белорусской породной группы с комплексным генотипом *DGAT1*^{KK} *GH*^{LL} *PRL*^{AB} *BLG*^{AB} — $6207,38 \pm 248,84$ кг и по этому показателю они превосходили первотелок, имеющих самый низкий удой (комплексный генотип *DGAT1*^{KK} *GH*^{LL} *PRL*^{AB} *BLG*^{AA} — $5367,60 \pm 237,66$ кг) на 15,6% ($P < 0,01$). Удой первотелок с другими полиморфными вариантами генотипов составил: *DGAT1*^{KK} *GH*^{LL} *PRL*^{AA} *BLG*^{AA} — $5759,56 \pm 229,89$ кг; *DGAT1*^{KK}

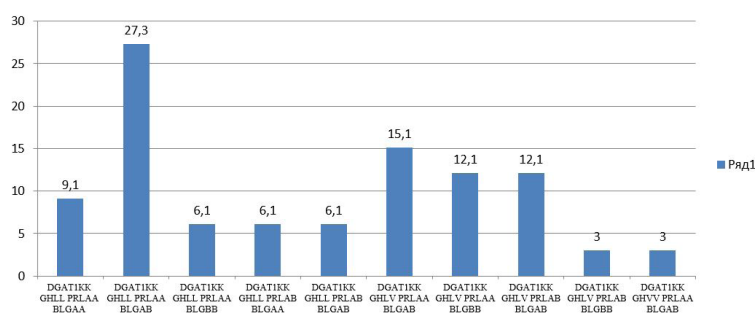


Рис. 7. Соотношение коров красной белорусской породной группы третьей лактации с выявленными комбинациями генотипов генов диацилглицерол О-ацил трансферазы 1 (*DGAT1*), соматотропина (*GH*), пролактина (*PRL*) и бета-лактоглобулина (*BLG*)

$GH^{LL} PRL^{AA} BLG^{AB}$ — $5739,53 \pm 235,81$ кг; $DGAT1^{KK} GH^{LV} PRL^{AA} BLG^{AA}$ — $6195,60 \pm 141,23$ кг; $DGAT1^{KK} GH^{LV} PRL^{AA} BLG^{AB}$ — $5803,40 \pm 248,10$ кг; $DGAT1^{KK} GH^{LV} PRL^{AA} BLG^{BB}$ — $5556,40 \pm 153,22$ кг и $DGAT1^{KK} GH^{LV} PRL^{AB} BLG^{AB}$ — $5613,83 \pm 230,10$ кг. По этому показателю они превосходили первотелок с комплексным генотипом $DGAT1^{KK} GH^{LL} PRL^{AB} BLG^{AA}$, имеющих наименьший удой на 7,3% ($P < 0,05$), на 6,9% ($P < 0,05$), на 15,4% ($P < 0,01$), на 8,1% ($P < 0,05$), на 3,5% и на 4,5% соответственно. По массовой доле жира в молоке наиболее высокие показатели имели первотелки с комплексным генотипом $DGAT1^{KK} GH^{LL} PRL^{AA} BLG^{AB}$ — $4,34 \pm 0,06\%$. По этому показателю они превосходили первотелок, имеющих такие комплексы генотипов как: $DGAT1^{KK} GH^{LL} PRL^{AA} BLG^{AA}$ на 0,11 п. п.; $DGAT1^{KK} GH^{LL} PRL^{AB} BLG^{AA}$ на 0,33 п. п. ($P < 0,01$), с комплексным генотипом $DGAT1^{KK} GH^{LL} PRL^{AB} BLG^{AB}$ на 0,30 п. п. ($P < 0,01$); $DGAT1^{KK} GH^{LV} BLG^{AA}$ на 0,14 п. п. ($P < 0,05$); $DGAT1^{KK} GH^{LV} PRL^{AA} BLG^{AB}$ на 0,29 п. п. ($P < 0,01$); $DGAT1^{KK} GH^{LV} PRL^{AA} BLG^{BB}$ на 0,28 п. п. ($P < 0,01$) и $DGAT1^{KK} GH^{LV} PRL^{AB} BLG^{AB}$ на 0,39 п. п. ($P < 0,01$) соответственно.

Что касается массовой доли белка в молоке, то наиболее высокий показатель также имели первотелки с комплексным генотипом $DGAT1^{KK} GH^{LL} PRL^{AA} BLG^{AB}$ — $3,52 \pm 0,05\%$, самые низкие — первотелки с сочетанием генотипа $DGAT1^{KK} GH^{LV} PRL^{AA} BLG^{BB}$ — $3,26 \pm 0,07\%$. Первотелки с другими вариантами генотипов по массовой доле белка в молоке имели показатели в интервале от $3,33 \pm 0,07\%$ до $3,45 \pm 0,09\%$. По количеству молочного жира и белка в молоке самые высокие качественные показатели имели первотелки с комплексным генотипом $DGAT1^{KK} GH^{LV} PRL^{AA} BLG^{AA}$ — $260,40 \pm 8,84$ кг и $212,20 \pm 6,73$ кг соответственно, самые низкие — первотелки с сочетанием генотипов $DGAT1^{KK} GH^{LL} PRL^{AB} BLG^{AA}$ — $215,80 \pm 12,64$ кг и $187,80 \pm 11,91$ кг соответственно. У первотелок с комплексом генотипа $DGAT1^{KK} GH^{LL} PRL^{AA} BLG^{AB}$ количество молочного жира и белка в молоке составило $250,00 \pm 12,36$ кг ($P < 0,01$) и $201,59 \pm 8,21$ кг ($P < 0,05$) соответственно.

При анализе показателей молочной продуктивности коров красной белорусской породной группы второй лактации с полимор-

фными вариантами генов $DGAT1$, GH , PRL и BLG было установлено, что по удою наиболее высокие показатели имели коровы с комплексным генотипом $DGAT1^{KK} GH^{LL} PRL^{AA} BLG^{AB}$ — $5762,00 \pm 254,37$ кг и по этому показателю они превосходили коров с такими комбинациями генотипов как: $DGAT1^{KK} GH^{LL} PRL^{AA} BLG^{AA}$ на 1,5%; $DGAT1^{KK} GH^{LV} PRL^{AA} BLG^{AB}$ на 5,6% ($P < 0,05$); $DGAT1^{KK} GH^{LV} PRL^{AA} BLG^{BB}$ на 1,4% и коров с комплексным генотипом $DGAT1^{KK} GH^{LV} PRL^{AB} BLG^{AB}$ на 8,0% ($P < 0,05$) соответственно.

По массовой доле жира в молоке наиболее высокий показатель имели животные с комплексным генотипом $DGAT1^{KK} GH^{LL} PRL^{AA} BLG^{AB}$ — $4,33 \pm 0,06\%$, которые превосходили коров с комбинацией генотипов: $DGAT1^{KK} GH^{LL} PRL^{AA} BLG^{AA}$ — на 0,05 п. п.; $DGAT1^{KK} GH^{LV} PRL^{AA} BLG^{AB}$ — на 0,21 п. п. ($P < 0,05$); $DGAT1^{KK} GH^{LV} PRL^{AA} BLG^{BB}$ — 0,24 п. п. ($P < 0,05$) и $DGAT1^{KK} GH^{LV} PRL^{AB} BLG^{AB}$ — 0,22 п. п. ($P < 0,05$) соответственно.

По массовой доле белка в молоке наиболее высокий показатель имели животные с комплексным генотипом $DGAT1^{KK} GH^{LL} PRL^{AA} BLG^{AA}$ — $3,53 \pm 0,10\%$, самый низкий — животные с сочетанием генотипа $DGAT1^{KK} GH^{LV} PRL^{AA} BLG^{AB}$ — $3,23 \pm 0,09\%$. У коров с другими комплексными генотипами массовая доля белка находилась в пределах $3,30 \pm 0,12\%$ – $3,47 \pm 0,07\%$.

Что касается количества молочного жира и белка в молоке, то наиболее высокие показатели также были у животных второй лактации с комплексным генотипом $DGAT1^{KK} GH^{LL} PRL^{AA} BLG^{AB}$ — $249,08 \pm 11,97$ кг и $199,17 \pm 8,71$ кг соответственно и по этим показателям они превосходили коров второй лактации, имеющих самые низкие показатели комплексный генотип $DGAT1^{KK} GH^{LV} PRL^{AB} BLG^{AB}$ — $218,20 \pm 8,29$ кг и $174,60 \pm 7,87$ кг на 14,1% ($P < 0,01$) и на 14,0% ($P < 0,01$) соответственно.

К третьей лактации из проанализированной выборки осталось 14 коров, имеющих сочетания генотипа $DGAT1^{KK} GH^{LL} PRL^{AA} BLG^{AB}$ (9 голов) и $DGAT1^{KK} GH^{LV} PRL^{AA} BLG^{AB}$ (5 голов).

При анализе показателей молочной продуктивности коров красной белорусской породной группы по третьей лактации с комплексными генотипами генов $DGAT1$, GH , PRL , BLG бы-

Таблица 3
Ассоциация комплексных генотипов генов диацилглицерол О-ацил трансферазы 1 (*DGAT1*), соматотропина (*GH*), пролактина (*PRL*) и бета-лактоглобулина (*BLG*) с показателями молочной продуктивности коров красной белорусской породной группы, ($\bar{X} \pm m$)

№ п/п	Генотип	n	Показатели				
			Удой за 305 дней лактации, кг	Массовая доля жира, %	Количество молочного жира, кг	Массовая доля белка, %	Количество молочного белка, кг
Перволетки красной белорусской породной группы							
1	DGAT1 ^{KK} GH ^{LL} PRL ^{AA} BLG ^{AA}	9	5759,56 ± 229,89*	4,23 ± 0,09*	243,22 ± 10,89	3,45 ± 0,09	197,56 ± 6,63
2	DGAT1 ^{KK} GH ^{LL} PRL ^{AA} BLG ^{AB}	17	5739,53 ± 235,81*	4,34 ± 0,06**	250,00 ± 12,36**	3,52 ± 0,05**	201,59 ± 8,21*
3	DGAT1 ^{KK} GH ^{LL} PRL ^{AB} BLG ^{AA}	6	5367,60 ± 237,66	4,01 ± 0,09	215,80 ± 12,64	3,48 ± 0,11**	187,80 ± 11,91
4	DGAT1 ^{KK} GH ^{LL} PRL ^{AB} BLG ^{AB}	8	6207,38 ± 248,84**	4,04 ± 0,12	251,63 ± 11,63**	3,40 ± 0,07	210,25 ± 6,40**
5	DGAT1 ^{KK} GH ^{LV} PRL ^{AA} BLG ^{AA}	5	6195,60 ± 141,23**	4,20 ± 0,11	260,40 ± 8,84*	3,42 ± 0,10	212,20 ± 6,73**
6	DGAT1 ^{KK} GH ^{LV} PRL ^{AA} BLG ^{AB}	10	5803,40 ± 248,10*	4,05 ± 0,12	237,60 ± 13,63	3,33 ± 0,07	194,30 ± 11,97
7	DGAT1 ^{KK} GH ^{LV} PRL ^{AA} BLG ^{BB}	5	5556,40 ± 153,22	4,06 ± 0,20	225,60 ± 13,06	3,26 ± 0,07	187,75 ± 15,25
8	DGAT1 ^{KK} GH ^{LV} PRL ^{AB} BLG ^{AB}	6	5613,83 ± 230,10	3,95 ± 0,11	219,83 ± 9,89	3,35 ± 0,09	188,00 ± 11,74
Коровы красной белорусской породной группы второй лактации							
1	DGAT1 ^{KK} GH ^{LL} PRL ^{AA} BLG ^{AA}	5	5672,60 ± 314,05	4,28 ± 0,07*	242,40 ± 12,89	3,53 ± 0,10*	199,20 ± 12,35
2	DGAT1 ^{KK} GH ^{LL} PRL ^{AA} BLG ^{AB}	12	5762,00 ± 254,37*	4,33 ± 0,06**	249,08 ± 11,97**	3,47 ± 0,07*	199,17 ± 8,71**
3	DGAT1 ^{KK} GH ^{LV} PRL ^{AA} BLG ^{AB}	5	5452,80 ± 224,63	4,12 ± 0,12	229,40 ± 13,50	3,23 ± 0,09	179,20 ± 13,57
4	DGAT1 ^{KK} GH ^{LV} PRL ^{AA} BLG ^{BB}	6	5678,00 ± 174,46*	4,09 ± 0,12	232,50 ± 12,79*	3,34 ± 0,11	189,50 ± 11,42*
5	DGAT1 ^{KK} GH ^{LV} PRL ^{AB} BLG ^{AB}	5	5331,20 ± 247,35	4,11 ± 0,11	218,20 ± 8,29	3,30 ± 0,12	174,60 ± 7,87
Коровы красной белорусской породной группы третьей лактации							
1	DGAT1 ^{KK} GH ^{LL} PRL ^{AA} BLG ^{AB}	9	5986,33 ± 159,43*	4,17 ± 0,04**	249,11 ± 7,71*	3,40 ± 0,05*	203,00 ± 6,16*
2	DGAT1 ^{KK} GH ^{LV} PRL ^{AA} BLG ^{AB}	5	5595,40 ± 238,23	3,83 ± 0,09	214,80 ± 12,55	3,27 ± 0,07	183,60 ± 11,53

Примечание. * — $P < 0,05$; ** — $P < 0,01$

ло установлено, что по всем изучаемым показателям наиболее высокие значения имели коровы с комплексным генотипом $DGAT1^{KK} GH^{LL} PRL^{AA} BLG^{AB}$. Так, удой у них составил $5\,986,33 \pm 159,43$ кг, массовая доля жира и белка в молоке $4,17 \pm 0,04\%$ и $3,40 \pm 0,05\%$ соответственно. Количество молочного жира и белка было $249,11 \pm 7,71$ кг и $203,00 \pm 6,16$ кг соответственно. У животных с комплексным генотипом $DGAT1^{KK} GH^{LV} PRL^{AA} BLG^{AB}$ удой составил $5\,595,40 \pm 238,23$ кг, массовая доля жира и белка в молоке — $3,83 \pm 0,09\%$ и $3,27 \pm 0,07\%$ соответственно, а количество молочного жира и белка в молоке — $214,80 \pm 12,55$ кг и $183,60 \pm 11,53$ кг соответственно.

Заключение

Таким образом, оценка ассоциированного влияния комплексных генотипов генов диацилглицерол О-ацил трансферазы 1 ($DGAT1$), соматотропина (GH), пролактина (PRL) и бета-лактоглобулина (BLG) с показателями молочной продуктивности коров красной белорусской породной группы показала, что наиболее высокие показатели молочной продуктивности имели животные с комплексным генотипом $DGAT1^{KK} GH^{LL} PRL^{AA} BLG^{AB}$.

Список использованных источников

1. Погорельский, И. А. Полиморфизм генов бета-лактоглобулина, гормона роста и пролактина и влияние их генотипов на молочную продуктивность коров / И. А. Погорельский, Г. Н. Сердюк, М. В. Позовникова // Молочное и мясное скотоводство. — 2014. — № 6. — С. 9–13.
2. Хабибрахманова, Я. А. Генный полиморфизм молочных пород скота / Я. А. Хабибрахманова, Ш. Р. Мещеров, Л. А. Калашникова // Съезд генетиков и селекционеров, посвященный 200-летию со дня рождения Ч. Дарвина. V Съезд ВОГИС, Москва, 21–28 июня 2009 г. — Москва, 2009. — 110 с.
3. Полиморфизм генов гормона роста и пролактина в связи с признаками качества молока у крупного рогатого скота ярославской породы / И. В. Лазебная [и др.] // Сельскохозяйственная биология. — 2012. — № 2. — С. 39–44.
4. Калашникова, Л. А. Влияние полиморфизма генов молочных белков и гормонов на молочную продуктивность коров черно-пестрой породы / Л. А. Калашникова, Я. А. Хабибрах-

манова, А. Ш. Тинаев // Доклады РАСХН. — 2009. — № 3. — С. 49–52.

5. Маниатис, Т. Молекулярное клонирование / Т. Маниатис, Э. Фрич, Дж. Сэмбрук. — М.: «Мир». — 1984 — 480 с.

6. Komisarek, J. Effects of $DGAT1$ variants on milk production traits in Jersey cattle / J. Komisarek, K. Waskowicz, A. Michalak, Z. Dorynek. Animal Science Papers and Reports. — Vol. 22. — 2004. — № 3. — P. 307–313.

7. Grochowska, R. Stimulated growth hormone (GH) release in Friesian cattle with respect to GH genotypes / R. Grochowska, L. Zwierzchowski, M. Snochowski, Z. Reklewski. Respond. Nutr. Dev. 39. 1999. — P. 171–180.

8. Ardicli, S. Comprehensive assessment of candidate genes associated with fattening performance in Holstein-Frisian bulls / S. Ardicli, H. Samli, B. Vatansever, B. Soyudal, D. Dincel, F. Balci. Archives Animal Breeding. 62,9 – 32, 2019.

9. Thy, N. T. D. Polymorphism of PIT-1 and Prolactin Genes and Their Effects on Milk Yield in Holstein Frisian Dairy Cows Bred in Vietnam / N. T. D. Thy, N. T. Thu, N. H. Cuong, L. V. Ty, T. T. B. Ngyen, D. V. A. Khoa. Russian Journal of Genetics. — 2018. — Vol. 54, № 3. — P. 346–352.

10. Меркурьева, Е. К. Биометрия в селекции и генетике. / Е. К. Меркурьева. — М.: Колос, 1970. — 423 с.

11. Меркурьева, Е. К. Генетика с основами биометрии / Е. К. Меркурьева, Г. Н. Шангин-Березовский. — М.: Колос, 1983. — 400 с.

12. Плохинский, Н. А. Биометрия / Н. А. Плохинский. — М.: АН СССР, 1969. — 360 с.

13. Зиннатова, Ф. Ф. Роль генов липидного обмена ($DGAT1$, $TG5$) в улучшении хозяйственно-полезных признаков крупного рогатого скота / Ф. Ф. Зиннатов // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н. Э. Баумана. — 2014. — Т. 219. — С. 164–168.

14. Grisart B. Positional candidate cloning of a QTL in dairy cattle: identification of a missense mutation in the bovine $DGAT1$ gene with major effect on milk yield and composition / B. Grisart, W. Coppieters, F. Farnir [et.al.] // Genome Research. — 2002. — Vol. 12(2). — P. 222–231.

A. N. Mikhaliuk, L. A. Tanana

**ASSOCIATION BETWEEN THE COMPLEX OF POLYMORPHIC
VARIANTS OF *DGAT1*, *GH*, *PRL* AND *BLG* GENES AND MILK YIELD
INDICATORS OF THE COWS OF THE BELARUSIAN RED BREED
GROUP**

Educational Institution
"Grodno State Agrarian University"
28 Tereshkova St., 230008 Grodno, Republic of Belarus
e-mail: alex-vet@mail.ru

When assessing an associated effect of the complex of polymorphic variants of genes of diacylglycerol O-acyltransferase 1 (*DGAT1*), somatotropin (*GH*), prolactin (*PRL*), beta-lactoglobulin (*BLG*) with the dairy productivity indicators of cows of the Belarusian red breed group, it was found that the highest indicators were demonstrated by the animals with the complex genotype *DGAT1^{KK} GH^{LL} PRL^{AA} BLG^{AB}*.

Keywords: cattle, complex genotypes by genes of diacylglycerol O-acyl transferase 1 (*DGAT1*), somatotropin (*GH*), prolactin (*PRL*), beta-lactoglobulin (*BLG*), dairy productivity.

Дата поступления в редакцию: 05 сентября 2022 г.

Е. И. Машков, Е. С. Гайдученко

ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ ВОСТОЧНОЕВРОПЕЙСКОЙ ПОЛЕВКИ (*MICROTUS ROSSIAEMERIDIONALIS*) В БЕЛАРУСИ

Государственное научно-производственное объединение
«Научно-практический центр Национальной академии наук Беларуси по биоресурсам»
Республика Беларусь, 220072, г. Минск, ул. Академическая, д. 27
e-mail: zoology@biobel.by

Представлены данные о генетической вариабельности гена *mt Cytb* восточноевропейской полевки (*Microtus rossiaemeridionalis*) Беларуси. Всего в ходе работ были проанализированы гаплотипы 27 особей восточноевропейской полевки из 8 стран. Для подтверждения видовой принадлежности криптических видов *Microtus arvalis* s.l. также был проведен кариологический анализ. По обоим критериям определен видовой состав криптической группы: *Microtus arvalis* «arvalis» (2n = 46, NF = 84) и *Microtus rossiaemeridionalis* (2n = 54, NF = 56). Была подтверждена принадлежность восточноевропейской полевки, обитающей на территории Беларуси, к волне колонизации из Южной Азии по северному коридору (европейской субкладе) и возможному повторному заселению данной территории из Уральского рефугиума после последнего оледенения (12 900–11 700 тыс. лет назад). Установлены пути дальнейшего распространения вида в северную и южную части Европы.

Ключевые слова: *Microtus rossiaemeridionalis*, ПЦР–типирование, Беларусь, Европа, гаплотип, *mt Cytb*, кариология, рефугиум, расселение.

Введение

Использование в работе различных авторов комбинации генетических маркеров и информации о локусах митохондриальной ДНК (мтДНК) открыло возможности для исследования филогенетических отношений и биогеографической истории грызунов рода *Microtus* (Cricetidae: Arvicolinae: полевки), которые, подвергаясь взрывным волнам видообразования, а также активной колонизации, стали самой интересной группой из современных млекопитающих для изучения [1].

Для рода *Microtus* остается много систематических неопределенностей. Количество официально установленных видов в пределах рода широко варьируется среди систематиков [2, 3]. Начиная с предполагаемого происхождения вида в Южной Азии, его эволюционная история включала три основных независимых события колонизации, приведших к нынешнему распространению: одна волна колонизации из Южной Азии в Северную Азию, вторая — в Европу, а третья — через Берингский наземный мост в Северную Америку [4, 5]. Проведенные ранее молекулярные таксономические исследования с использо-

ванием митохондриального гена цитохрома b (*mt Cytb*) показали незначительный уровень различий видов из разных волн колонизации [6]. Так, восточноевропейская полевка в наибольшей степени имеет генетическое сходство с американскими и азиатскими видами (*M. kikuchii*; *M. townsendii*; *M. schelkovnikovi*, *M. socialis*) [5].

Согласно результатам оценки полиморфизма гена *mt Cytb* восточноевропейской полевки, ранее было выделено две филогенетические линии мтДНК [7, 8]. Четкая географическая приуроченность данных линий представлена двумя субкладами: первая встречается на территории Северного Ирана, вторая — в Европе [9]. После проникновения *M. rossiaemeridionalis* в Европу [6] дальнейшее ее расселение проходило как на север (Норвегия, Финляндия), так и на юг (Украина, Румыния, Болгария, Греция) [10, 11]. Также из Центральной Европы экспансия вида осуществлялась в сторону Кавказа. Наибольшее сходство образцов с Кавказа с гаплотипами из Греции, Норвегии и Финляндии [6], а также группой близких гаплотипов из Украины [10], указывает

на североευропейское происхождение популяции полевков из исследуемого региона [11]. Географически менее удаленный Турецкий кластер по отношению к особям восточно-европейской полевки из Кавказа, имеет относительно низкий уровень дивергенции, который составляет менее одного процента (d , $T3P = 0,004 \pm 0,002$), и значительно большую дистанцию (d , $T3P = 0,017 \pm 0,005$), что говорит о различных путях колонизации данных регионов [5, 8].

Несмотря на полученные филогеографические данные о расселении восточноевропейской полевки в западной части ареала, остался открытым вопрос о распространении вида в центральной части Европы и его дальнейшей экспансии, так как в работах других авторов [6, 8, 12] дана различная интерпретация при описании филогенетических связей.

В связи с малым количеством исследованных проб из центральной части Европы, а также полным отсутствием образцов восточноевропейской полевки из Беларуси, целью данной работы является определение генетического статуса данного вида, описание истории его колонизации современной территории Беларуси.

Материалы и методы

Для установления таксономического статуса криптической группы *Microtus arvalis* s.l. в Беларуси, проведенные нами исследования затронули большинство районов страны (2018–2021 гг.).

Отлов зверьков проводился на пойменных и внепойменных, суходольных и низинных лугах, а также на мелиоративных участках [13].

В большинстве районов исследования установлено обитание одного вида – двойника (*M. arvalis* формы «arvalis») [13, 14]. Присутствие восточноевропейской полевки установлено только в двух локалитетах (2 — пойма р. Березина, луг пойменный, Светлогорский район и 1 — луг суходольный, Зельвенский район, рис. 1).

Анализ соматических хромосом полевков проводился на препаратах клеток костного мозга и селезенки. Препараты метафазных хромосом получали из клеток костного мозга по общепринятой методике воздушно-высушенных препаратов с предварительным колхицинированием живых зверьков [16].

Дифференциальное окрашивание хромосом проводилось с использованием методики

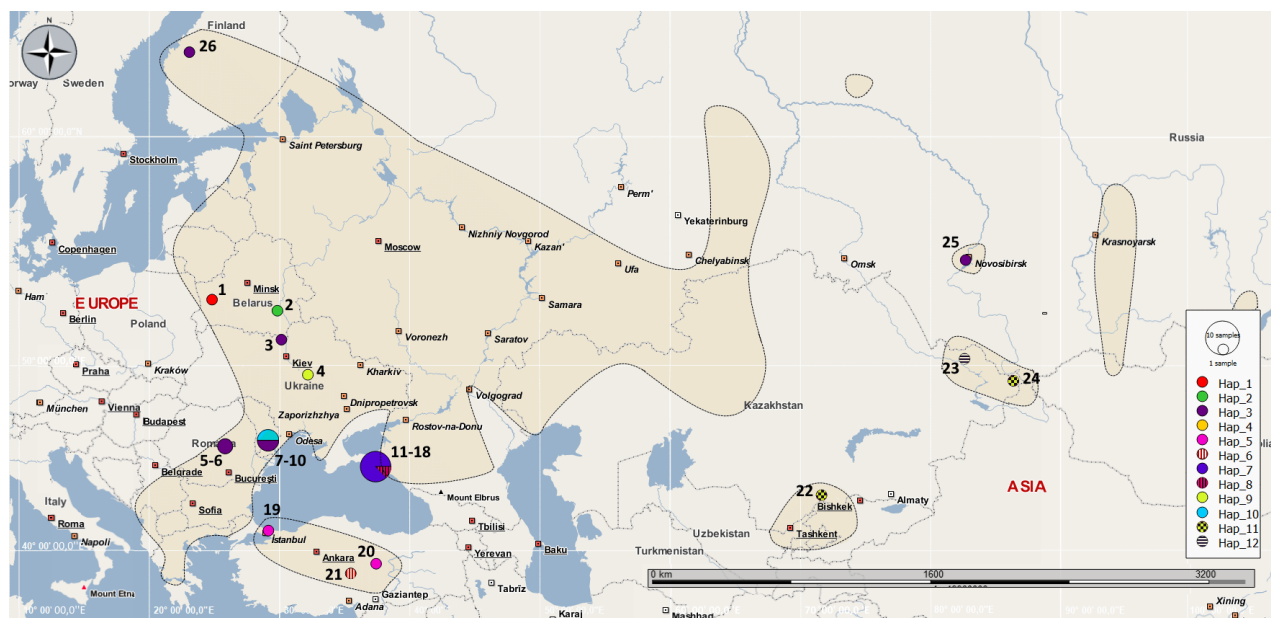


Рис. 1. Географическое распределение гаплотипов по гену *mt Cytb* *M. rossiaemeridionalis* (секвенированных для текущего исследования 1 — окр. г. Зельва, Гродненская область; 2 — окр. д. Якимова Слобода, Светлогорский район, Гомельская область) и депозитов из GenBank (NCBI) (3–27) [6, 10, 11, 12, 15]. Желтая область показывает ареал вида в Евразии. Места отбора проб окрашены в соответствии с выявленным гаплотипом (рис. 2, 3). Места, пронумерованные на карте, перечислены в таблице 1 (на рисунке не представлен Hap 4 (Svalbard, Norway) (27))

стандартного окрашивания по Романовско-му-Гимза [17].

С помощью методики видоспецифического ПЦР проведена молекулярно-генетическая диагностика восточноевропейской полевки [18].

Для амплификации *Cytb* были использованы праймеры для трех криптических видов: cbMO 604F (5'-CCTTCCACTTTATTCTACCT-3'), cbMA 842F (5'-GGGGTTTACTATGGCTCA-3'), cbMR 469F (5'-CAGTCAAAGACTTCTTAGGG-3') с обратным праймером H15915-SP (5'-TTCATTACTGGTTTACAAGAC-3'). При этом у разных особей криптических видов амплифицируется фрагмент гена *Cytb* разной длины [18].

Определение последовательности нуклеотидов амплифицированных фрагментов ДНК для гена *Cytb* проводили с праймерами cbMR 469F на автоматическом анализаторе Applied Biosystems 3500 с использованием набора реактивов ABI PRISM BigDye Terminator v.1.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems). Проведено секвенирование фрагмента *Cytb* раз-

мером 469 нуклеотидных оснований (н. о.). Для сравнения использованы нуклеотидные последовательности из GenBank (NCBI).

Последовательности каждой особи были выравнены с использованием алгоритма Clustal W [19] и реализованы в программе BioEdit 5.0.9, отредактированы вручную для обеспечения консервативности выравнивания [20]. Гаплотипы были идентифицированы с помощью программы DNAsp. Нуклеотидное разнообразие также оценивалось с помощью DNAsp [21].

Медианная сеть для 27 последовательностей построена с помощью пакета программ MEGA 10.0 с использованием median-joining (MJ) алгоритма и ML-анализа для конструирования филогенетических деревьев [22].

В исследуемую выборку для сравнительной филогеографии были включены образцы *M. rossiaemeridionalis* из базы NCBI GenBank (25 образцов) [6, 8, 10, 11, 12, 15, 23]. Информация об образцах из NCBI GenBank приведена в таблице 1.

Таблица 1
Последовательности образцов *Cytb* *M. rossiaemeridionalis* из NCBI GenBank

Присвоенный номер NCBI GenBank	№ п/п (рис. 1)	Номер гаплотипа (рис. 4, 5)	Страна. И использованная литература
#AY513819.1	26	3	Финляндия (Jaarola et al. 2004)
#AY513820.1	27	4	Норвегия (Jaarola et al. 2004)
#AY513821.1, #AY513822.1, #AY513823.1	19, 21, 20	5, 6, 5	Турция (Yigit, 2007)
#KU957994.1, #KU957995.1, #KU957996.1, #KU957997.1, #KU957998.1, #KU957999.1, #KU958000.1, #KU958001.1, #MZ198210.1	11–18, 25	7, 7, 8, 7, 7, 7, 7, 3	Россия (Balakirev et al. 2017)
#KX380179.1, #KX380180.1	5, 6	3, 3	Румыния (Stojak, 2016)
#KX380181.1, #KX380182.1, #KX380183.1, #KX380184.1, #KX380185.1, #U54477.1	4, 7, 8, 9, 10, 3	9, 3, 10, 3, 10, 3	Украина (Stojak, 2015, Barker, 1996)
#LT970847.1, #LT970849.1, #LT978502.1	24, 23, 22	11, 12, 11	Казахстан (Volfova, 2018)

Примечание. Данные о нуклеотидных последовательностях взяты из работ зарубежных авторов [6, 8, 10, 11, 12, 15, 23]

Результаты и обсуждение

Применяемый в работе метод кариотипирования как способ определения видовой идентификации представителей криптической группы *M. arvalis s.l.*, позволил изучить цитогенетические характеристики у исследуемых особей из 21 локалитета Беларуси.

На основании результатов данного кариологического исследования (всего проанализиро-

вано 2 900 отдельных метафазных пластинок от экземпляров видов-двойников), в исследуемых биотопах было выявлено обитание 2-х представителей криптической группы.

У особи из окраины д. Якимова Слобода (Светлогорский район, Гомельская область) (рис. 1) в диплоидном наборе было обнаружено характерное для вида *M. rossiaemeridionalis* количество хромосом ($2n = 54$, $NF = 56$) (рис. 2) [14].

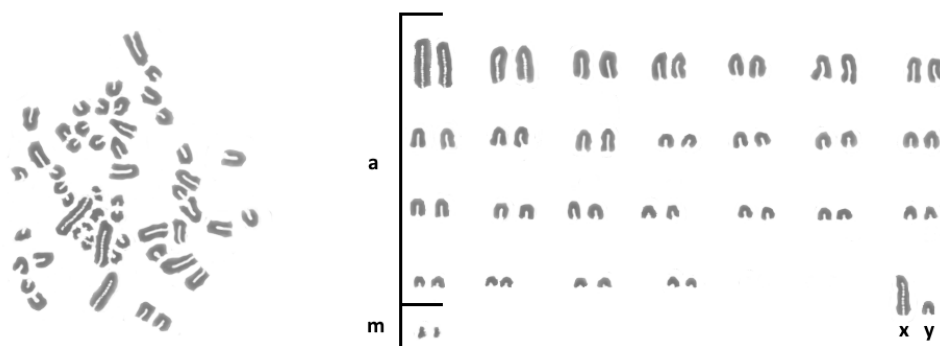


Рис. 2. Кариотип восточноевропейской полевки. Самец с нормальным кариотипом $2n = 54$, $NF = 56$ (205.1-20Б, Светлогорский район, Гомельская область); а — акроцентрики; m — метацентрики; x, y — половые хромосомы [14]

Современные молекулярно-генетические методы позволяют более эффективно и точно проводить видовую идентификацию, что особенно актуально в случае с криптическими видами. Впервые на обширной территории Беларуси, охватывающей 42 административных района, проведены исследования по выявлению криптических видов обыкновенной полевки с помощью молекулярно-генетического метода (видоспецифического

ПЦР). Благодаря данной методике удалось установить, а в части районов, где проводились кариологические исследования, подтвердить видовой состав криптической группы. *M. arvalis* формы «*arvalis*» отмечена во всех локалитетах исследования, а вид-двойник (*M. rossiaemeridionalis*) — в двух локалитетах (пойма р. Березина, луг пойменный, Светлогорский район и луг суходольный, Зельвенский район) (рис. 3).



Рис. 3. Электрофореграмма фрагментов ДНК представителей рода *Microtus*, полученных видоспецифическим ПЦР по фрагменту гена *Cytb* (Светлогорский район). 1 — DNA Ladder; 2–5, 7–8 — продукты амплификации целевого фрагмента (842 н. о.), 6 — продукты амплификации целевого фрагмента (469 н. о.) [14]

Полученные в ходе исследования нуклеотидные последовательности фрагмента гена *Cytb* имели длину 385 н. о. Белорусские образцы *M. rossiaemeridionalis* представлены самостоятельными гаплотипами (Hap 1, 2) (рис. 4).

Проведенный ML-анализ нуклеотидных последовательностей восточноевропейской полевки позволил построить дендрограмму и объединить в группы наиболее близкие гаплотипы восточноевропейской полевки в Евразии (рис. 4).

Распределение выявленных гаплотипов подтверждает предположение об экспансии обыкновенной полевки из Южной Азии (Hap 11, 12) в Европу [5]. Одна часть распространялась по южному коридору (Hap 5, 6), а другая — в центральную часть Европы (Hap 1–4, 7–10). Среди анализируемых гаплотипов присутствуют как специфичные, обнаружены в одном локалитете исследования (Hap 1, 2, 4, 12), так и широко распространен-

ные гаплотипы (Hap 3, 5, 11).

Также можно отметить некоторую удаленность Hap 1 от других европейских гаплотипов (Hap 2–4, 7–10). Ранее, в связи с отсутствием других представителей *M. rossiaemeridionalis* в прилегающих районах западной части Беларуси, нами было дано предположение, что наиболее вероятным путем проникновения следует считать продвижение по трансевропейскому транспортному коридору из Европейской части России, где данный вид расселен поместно [24]. Это объясняет возникшие филогенетические связи с анализируемыми образцами на дендрограмме и медианной сети (рис. 4, 5).

Построенная медианная сеть (PopART) по алгоритму Median Joining (объединение средних), с целью проведения более точной кластеризации гаплотипов восточноевропейской полевки, имеет нитевидную структуру (рис. 5). Анализируя образцы восточноевропейской по-

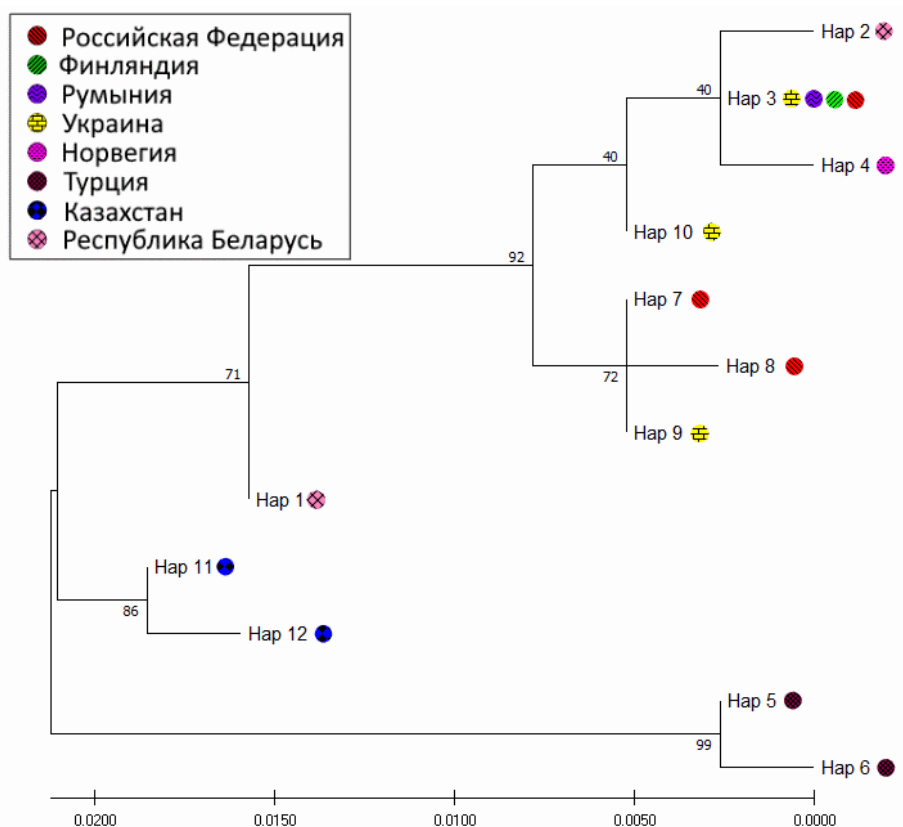


Рис. 4. Результаты генетического ML-анализа гаплотипов (n = 12) участка *Cytb* (385 н. о.), иллюстрирующие уровень генетических различий между гаплотипами. В узлах — результаты бутстреп-анализа (1 000 реплик), шкала — генетические дистанции между гаплотипами. Цветными точками указана принадлежность гаплотипа (Hap) тому или иному локалитету исследования (рис. 1, 5).

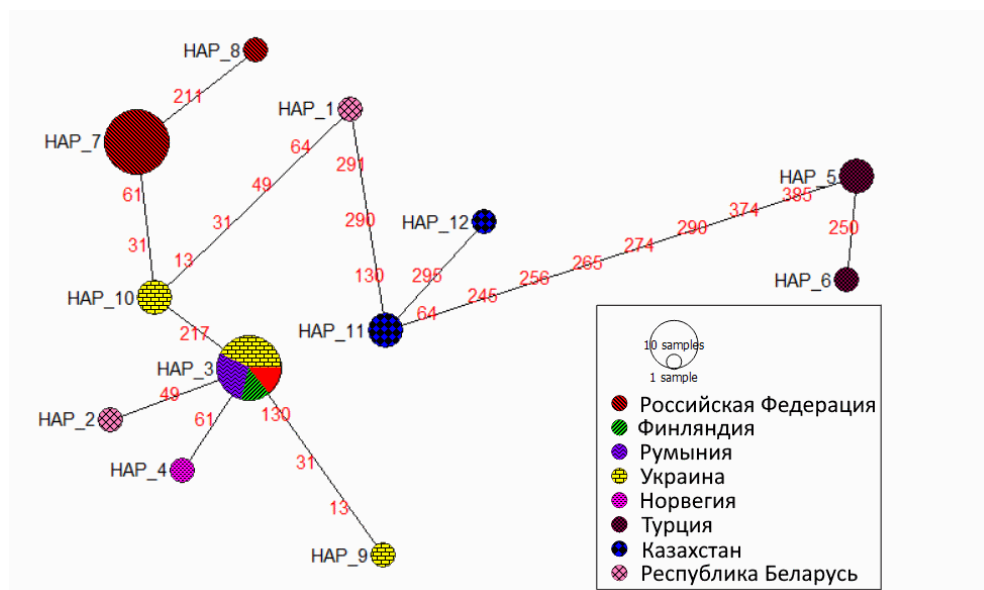


Рис. 5. Медианная сеть из 27 последовательностей фрагментов гена *mtCytb* (385 н. о.) *M. rossiaemeridionalis*. Цветные кружки обозначают гаплотипы, обнаруженные в образцах обыкновенной полевки, собранных в Беларуси и других странах Евразии (частоты этих гаплотипов не представлены). Цифры между узлами указывают на конкретные сайты мутаций. Радиус кругов пропорционален частоте гаплотипов

левки из Беларуси на медианной сети, можно предположить, что *Hap 1* дал начало распространению особей в центральной Европе (*Hap 10*) [11], а далее от более широко распространенного *Hap 3* в северную часть Европы (*Hap 4*) и на юг (*Hap 7, 8, 9*).

Также важно рассмотреть вероятность повторного заселения современной части восточного ареала *M. rossiaemeridionalis* в связи с процессами оледенения территории (Вислинские (вейхзелийские) ледяные щиты), которые достигли своей наибольшей протяженности примерно от 27 500 до 19 000 лет назад [25]. Наиболее вероятно, что в данный период убежищем для многих видов мелких млекопитающих послужил рефугиум в Уральских горах [26].

К наиболее широко распространенным гаплотипам по гену *mtCytb* в центральной Европе можно отнести *Hap 3*. Расстояние между наиболее удаленными находками составляет более 1 800 км (рис. 1).

Большой интерес представляет высокое сходство *Hap 3* с образцом из Норвегии (Шпицберген). Различия данных гаплотипов (*Hap 4* и *Hap 3*) в одну нуклеотидную позицию делают образцы восточноевропейской полевки наиболее близкородственными.

Являясь синантропным видом, восточноев-

ропейская полевка предпочитает селиться рядом с постройками человека [27]. Одним из признаков инвазии для млекопитающих является появление вида далеко за пределами нативной области распространения, что зачастую объясняется антропогенными факторами. Для полевок это, прежде всего, связано с сельскохозяйственным освоением земель человеком, начало которого можно датировать ранним неолитом (10 тыс. лет назад). Таким образом, можно объяснить присутствие восточноевропейской полевки за пределами основной части ареала и ее большое сходство с Европейскими образцами [28].

Полиморфизм (число нуклеотидных замен) *mtCytb* *M. rossiaemeridionalis* варьировал от 0,0 до 3,5% (в среднем $1,6 \pm 0,31$ %). Частота встречаемости составили для A = 31,4%, T = 25,7%, C = 31,2%, и G = 11,7%, а соотношение транзиций и трансверсий (Ts/Tv) составило 2,61 (R), что является стандартным значением для восточноевропейской полевки [9].

Значения гаплотипического разнообразия для исследуемой группы восточноевропейской полевки (европейская субклада) имеют невысокие показатели ($Hd = 0,795 \pm 0,062$) при сравнении с другими представителями крипто-ческой группы [11, 12]. Данный факт может быть связан с недостаточной выборкой ($n = 21$)

восточноевропейской полевки. Однако все же можно отметить наиболее широко распространенный гаплотип (*Нар 3*), который содержит эффективное число популяций, благодаря чему сохраняет генетическую целостность. Значение нуклеотидного разнообразия имеет бо-

лее низкие показатели ($\pi = 0,00574 \pm 0,00077$). Так, при наличии восьми полиморфных сайтов пять оказались филогенетически информативными. Генетические различия были минимальны, значение показателя общей генетической дистанции не превысило 0,009 (табл. 2).

Таблица 2

Данные генетического разнообразия *M. rossiaemeridionalis* по $_{mt}Cytb$

<i>M. rossiaemeridionalis</i>	<i>n</i>	<i>S</i>	<i>H</i>	<i>Hd</i> ± <i>SDHd</i>	π ± <i>SD</i> π	<i>k</i>	<i>p</i>	T's D
Европейская субклада	21	8	8	0,795 ± 0,062	0,00574 ± 0,00077	2,21	0,009	−0,02

Примечание. *n* — число последовательностей; *S* — число варибельных сайтов; *H* — число гаплотипов; *Hd* — гаплотипическое разнообразие; π — нуклеотидное разнообразие; *k* — среднее число нуклеотидных различий; *p* — общая генетическая дистанция; *SD* — стандартное отклонение; T's D — тест Таджимы

Для оценки значимости генетического полиморфизма, а также выяснения его природы используются критерии, отражающие наличие давления отбора. В качестве такого критерия использовали тест на нейтральность Таджимы [29], позволяющего оценить отклонения выявленного полиморфизма в исследуемой популяции от ожидаемых эволюционно нейтральных генетических изменений. Нейтральный показатель T's D = −0,02 (подтверждена статистическая значимость на уровне $p < 0,01$), (табл. 1), говорит о нейтральном характере возникающих изменений филогенеза и отсутствие доказательств отбора.

Для уточнения филогенетического статуса особей из Беларуси, нами были проанализированы последовательности $_{mt}Cytb$ *M. rossiaemeridionalis* депонированные из GenBank (NCBI). Выбранные особи относятся к европейской волне колонизации как по северному региону, так и по южному коридору, а также были взяты особи из предполагаемого места происхождения в Южной Азии (нынешняя территория Казахстана). Нитевидная разветвленность медианной сети гаплотипов восточноевропейской полевки свидетельствует о выборе особей, географически удаленных друг от друга, а также об обособленности некоторых гаплотипов (*Нар 5, 6; Нар 11, 12; Нар 2–4, 9, 10*), что говорит о заселении данных районов восточноевропейской полевкой

в разное время и разными путями [6].

Заключение

Учитывая данные проводимых исследований в 1980-х гг. [30] о распространении восточноевропейской полевки в Беларуси, где ранее было отмечено 9 мест ее обитания, причем в двух из них виды-двойники обитали совместно, на сегодняшний день установлено только два локалитета обитания восточноевропейской полевки (пойма р. Березина, луг пойменный, Светлогорский район и луг суходольный, Зельвенский район). Тенденция снижения численности вида в основной части ареала также отмечена зарубежными авторами [31, 32]. В связи с этим мы предполагаем, что несоответствие популяционных волн (в период проводимых исследований численность обыкновенной полевки была высокой), а также более агрессивное поведение обыкновенной полевки по отношению к особям обоих видов [9, 33], привело к возникновению депрессии численности восточноевропейской полевки.

При изучении распределения выявленных гаплотипов восточноевропейской полевки на медианной сети можно выявить зависимость различных филогенетических связей с путями экспансии вида и его предполагаемого происхождения в Южной Азии [4, 5].

Исследуя генетическую структуру популяции *M. rossiaemeridionalis* по $_{mt}Cytb$, была

подтверждена принадлежность восточноевропейской полевки, обитающей на территории Беларуси, к волне колонизации из Южной Азии по северному коридору и возможному повторному заселению из Уральского рефугиума [12]. А также подтверждены данные о заселении восточноевропейской полевкой современной территории Беларуси со стороны Европейской части России и ее дальнейшее распространение в северную и южную части Европы [6, 10, 11].

Уровень полиморфизма m_{Cytb} *M. rossiaemeridionalis* исследуемой группы оказался относительно высоким ($Hd = 0,795 \pm 0,062$). В целом можно сделать вывод, что генетическая дивергенция *M. rossiaemeridionalis* между популяциями Европы и Азии заметно низка, а процесс видообразования этого вида находится на ранних стадиях.

Выявленное генетическое разнообразие, а также группируемость восточноевропейской полевки в изучаемом макрогеографическом районе служит основой для предположительного описания распространения вида после повторного расселения из уральского рефугиума [12].

Работа выполнена в рамках написания диссертационного исследования «Криптические виды обыкновенной полевки *M. arvalis* s. l. в Беларуси: современный видовой статус и сравнительный анализ пространственно-биотической структуры» (2019–2021 гг). Работа была поддержана Белорусским республиканским фондом фундаментальных исследований на 2020–2022 (Проект Б20М-062).

Авторы благодарят д.б.н., член-корреспондента Баранова О. Ю. за ценные рекомендации в процессе подготовки рукописи статьи.

Список использованных источников

1. Griffiths, A. J. F. An introduction to genetic analysis / A. J. F. Griffiths, J. H. Miller, D. T. Suzuki, R. C. Lewontin, W. M. Gelbart // New York: Freeman. 2000. – 7 ed. – 860 p. DOI: 10.1023/A:1015187026471.
2. Nowak, R. M. Walker's mammals of the world / R. M. Nowak // 5th ed. Baltimore (MD): Johns Hopkins University Press. – 1991. – Vol. II: vii-x. – P. 643–1 629. <https://doi.org/10.2307/1381927>.

3. Musser, G. G. Mammal species of the world: a taxonomic and geographic reference / G. G. Musser, M. D. Carleton // Washington DC: Smithsonian Institution Press. – 1993. – P. 501–756.

4. Brunet-Lecomte, P. Morphological evolution and phylogenetic relationships of the European ground voles (Arvicolinae, rodentia) / P. Brunet-Lecomte, J. Chaline // Lethaia. 1991. – Vol. 24. – P. 45–53. <https://doi.org/10.1111/j.1502-3931.1991.tb01179.x>.

5. Fink, S. Genomic scans support repetitive continental colonization events during the rapid radiation of voles (Rodentia: Microtus): the utility of AFLPs versus mitochondrial and nuclear sequence markers / S. Fink, M.C. Fischer, L. Excoffier, G. Heckel // Syst Biol. – 2010. – Vol. 59(5). – P. 548–572. <https://doi.org/10.1093/sysbio/syq042>.

6. Jaarola, M. Molecular phylogeny of the speciose vole genus *Microtus* (Arvicolinae, Rodentia) inferred from mitochondrial DNA sequences / M. Jaarola, N. Martinkova, I. Gunduz et al // Mol. Phylogenet. Evol. – 2004. – Vol. 33. – P. 647–663. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2004.07.015>.

7. Mahmoudi, A., Darvish, J., Aliabadian, M. et al. New insight into the cradle of the grey voles (subgenus *Microtus*) inferred from mitochondrial cytochrome b sequences // Mammalia. – 2017. – Vol. 81, № 6. – P. 583–593. <https://doi.org/10.1515/mammalia-2016-0001>.

8. Volfova, T. New record of *Microtus mystacinus* in eastern Kazakhstan: Phylogeographical considerations / T. Volfova, F. Sedlacek, A. Macova, J. Vlček, J. Robovský // ZooKeys. – 2018. – Vol. 781. – P. 67–80. DOI: 10.3897/zookeys.781.25359.

9. Шереметьева, И. Н. Изменчивость контрольного региона мтДНК восточноевропейской полевки *Microtus rossiaemeridionalis* (Rodentia, Arvicolini) из двух инвазивных популяций юга Дальнего Востока России / И. Н. Шереметьева, И. В. Картавцева, А. А. Емельянова, А. С. Лапин // Генетика. 2021. – Т. 57, № 11. – С. 1 252–1 260. DOI 10.31857/S0016675821110138.

10. Baker, R. J. High levels of genetic change in rodents of Chernobyl / R. J. Baker, R. A. Van Den Bussche, A.vJ. Wright // Nature. – 1996. – Vol. 380, № 6 576. – P. 707–708. <https://doi.org/10.1038/380707a0>.

11. Балакирев, А. К видовому составу, рас-

- пространению и экологии полёвок (mammalia, cricetidae, microtina) северо-западного Кавказа / А. Балакирев, Т. Миронова, Л. Хляп, Л. Василенко, Н. Окулова // Поволжский Экологический Журнал. – 2017. – Т. 16. – С. 14–23. DOI:10.18500/1684-7318-2017-1-14-23
12. Stojak, J. Contrasting and congruent patterns of genetic structuring in two *Microtus* vole species using museum specimens / J. Stojak, J. M. Wójcik, I. Ruczyńska, J. B. Searle, A. D. McDevitt // Mamm Res. – 2016. – Т. 61. – P. 141–152. <http://dx.doi.org/10.1007/s13364-015-0260-y>.
13. Машков, Е. И. Видовой состав и плотность ассоциаций микромамманий луговых экосистем бассейнов крупных рек Беларуси / Е. И. Машков, Е. С. Гайдученко, И. А. Кришук, И. И. Лукина // Веснік Гродзенскага дзяржаўнага ўніверсітэта імя Янкі Купалы. Серыя 5. Эканоміка. Сацыялогія. Біялогія. – 2022. – Т. 12, № 1. – С. 108–125.
14. Машков, Е. И. Криптические виды рода *Microtus* на территории Беларуси: таксономическое положение и распространение / Е. И. Машков, Е. С. Гайдученко // Весці Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Серыя біялагічных навук. 2021. – Т. 66, № 4. – С. 475–481. DOI: 10.29235/1029-8940-2021-66-4-475-481.
15. Stojak, J. Post-glacial colonization of eastern Europe from the Carpathian refugium: evidence from mitochondrial DNA of the common vole *Microtus arvalis* / J. Stojak, D. Allan, J. S. McDevitt, at other // Biological Journal of the Linnean Society. – 2015. – Vol. 115. – I. 4. – P. 927–939. <http://dx.doi.org/10.1111/bij.12535>
16. Ford, C. E. A colchicines hypotonic citrate squash / C. E. Ford, J. L. Hamerton // Stain. Technol. – 1956. – Vol. 31. – P. 247–251. DOI: 10.3109/10520295609113814
17. Dutrillaux, B. Nouveau système de marquage chromosomique: les bandes T. / B. Dutrillaux // Chromosoma. 1973. – Т. 41. – P. 395–402. <https://doi.org/10.1007/BF00396497>
18. Потапов, С. Г. Молекулярно-генетические исследования (RAPD-анализ) *Microtus arvalis sensu lato* (Rodentia, Arvicolidae) на Русской равнине / С. Г. Потапов, Н. М. Окулова, М. И. Баскевич // Молекулярно-генетические основы сохранения биоразнообразия млекопитающих Голарктики. Материалы междунар. Конф. М.: КМК. – 2007. – С. 213–220.
19. Thompson, J. D. The CLUSTAL X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools / J. D. Thompson, T. J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin, D. G. Higgins // Nucleic Acids Res. – 1997. – Vol. 25. – P. 4 876–4 882. DOI: 10.1093/nar/25.24.4876.
20. Creer, S. Optimal intron analyses in the trimeresurus radiation of Asian pitvipers / S. Creer, C. E. Pook, A. Malhotra, R. S. Thorpe // Syst. Biol. – 2006. – Vol. 55. – P. 57–72. DOI: 10.1080/10635150500431213.
21. Rozas, J. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods / J. Rozas, J. C. Sanchez-DelBarrio, X. Messeguer, R. Rozas // Bioinformatics. – 2003. – Vol. 19. – P. 2 496–2 497. DOI: 10.1079/9780851994758.0139.
22. Bandelt, H. J. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies / H. J. Bandelt, P. Forster, A. Rohl // Molecular Biology and Evolution. – 1999. – Vol. 16. – P. 37–48. DOI: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a026036.
23. Yiğit, N. Reproductive Biology and Postnatal Development of *Microtus rossiaemeridionalis* Ognev, 1924 (Mammalia: Rodentia) Distributed in Turkey / N. Yiğit, T. Kankılıç, E. Çolak // Turkish Journal of Zoology. – 2007. – Vol. 31 (3). – P. 287–294.
24. Martínková, N. Divergent evolutionary processes associated with colonization of offshore islands / N. Martínková, R. Barnett, T. Cucchi, at other // Molecular Ecology. – 2013. – Vol. 22. – P. 5 205–5 220. <http://dx.doi.org/10.1111/mec.12462>.
25. Clark, P. U. The last glacial maximum / P. U. Clark, A. S. Dyke, J. D. Shakun, A. E. Carlson, J. Clark, B. Wohlfarth, J. X. Mitrovica, S. W. Hostetler, A.M. McCabe // Science. – 2009. – Vol. 325. – P. 710–714. DOI: 10.1126/science.1172873.
26. Markova, A.K. Small mammals from Palaeolithic sites of the Crimea / A.K. Markova // Quaternary International. – 2011. – Vol. 231. – P. 22–27. DOI: 10.1016/j.quaint.2010.07.016.
27. Мокеева, Т. М. Некоторые экологические и физиологические особенности видов-двойников обыкновенной полёвки *Microtus arvalis* и *M. subarvalis* (Rodentia, Cricetidae) / Т. М. Мокеева, Н. Ю. Ченцова // Зоол. журн. – 1981. – Т. 60, Вып. 5. – С. 752–763.

28. Markova, E. Surviving in the High Arctic: dental variation in a casually introduced population of *Microtus rossiaemeridionalis* (Arvicolinae, Rodentia) on Svalbard / E. Markova, P. Sibiryakov, D. Ehrich // *Acta Zoologica*. – 2015. – Vol. 97, № 4. – P. 442–453. DOI: 10.1111/azo.12138.
29. Tajima, F. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism / F. Tajima // *Genetics*. 1989. – Т. 123(3). – P. 585–595. doi: 10.1093/genetics/123.3.585.
30. Терехович, В. Ф. Таксономическое положение и распространение обыкновенной полевки на территории Беларуси / В. Ф. Терехович, Н. В. Манохина // Млекопитающие СССР : III съезд Всесоюз. териол. о-ва, Москва, 1–5 февр. 1982 г. : тез. докл. : в 2 т. / Акад. наук СССР, Всесоюз. териол. о-во, Ин-т эволюц. морфологии и экологии животных ; редкол. : П. А. Пантелеев (отв. ред.) [и др.]. – М., 1982. – Т. 1. – С. 82.
31. Çetintürk, D. Comparative Genetic Research on *Microtus levis* (Miller, 1908) Distributed in Asia and Europe Inferred From Mitochondrial *Cyt-b* and *COXI* / D. Çetintürk, N. Yiğit, R. Castiglia, G. Senczuk, E. Çolak // *Animal Biology*. – 2018. – P. 1–16. <https://doi.org/10.1163/15707563-bja10084>.
32. Markovska, O. Species composition of small mammals in key biotopes near Kolomak (Kharkiv Oblast) / O. Markovska // *Theriologia Ukrainica*. 2021. Vol. 20. – I. 2. – P. 105–114. <http://doi.org/10.15407/TU2005>.
33. Котенкова, Е. В. Распознавание представителей своего и близкородственного видов восточноевропейской (*Microtus rossiaemeridionalis*) и обыкновенной (*M. arvalis*) полевок (rodentia, arvicolinae): роль обонятельных сигналов / Е. В. Котенкова, Н. С. Липина, Г. Н. Тихонова, И. А. Тихонов, А. В. Суров // *Журнал: успехи современной биологии* Издательство: Российская академия наук (Москва). – 2008. – Т. 128, № 4. – С. 417–423.

E. I. Mashkov, H. S. Gajduchenko

GENETIC DIVERSITY OF THE EAST EUROPEAN VOLE (*MICROTUS ROSSIAEMERIDIONALIS*) IN BELARUS

State Research and Production Association

"Scientific and Practical Center of the National Academy of Sciences of Belarus for Bioresources"

27 Akademicheskaya St., 220072 Minsk, Republic of Belarus

e-mail: zoology@biobel.by

Data on the genetic variability of the *mtCytb* gene of the East European vole (*Microtus rossiaemeridionalis*) from Belarus are presented. In total, the haplotypes of 27 individuals of the East European vole from 8 countries were analyzed during the work. To verify the species belonging of the cryptic species *Microtus arvalis* s.l., a karyological analysis was also performed. The species composition of the cryptic group was determined by both genetic markers: *Microtus arvalis* "arvalis" (2n = 46, NF = 84) and *Microtus rossiaemeridionalis* (2n = 54, NF = 56). The East European vole inhabiting the territory of Belarus was confirmed to belong to the wave of colonization from South Asia along the northern corridor and possible re-settlement in this territory from the Ural refugium after the last glaciation (12 900–11 700 thousand years ago). The ways of further expansion of the species into the northern and southern parts of Europe were established.

Keywords: *Microtus rossiaemeridionalis*, PCR typing, Belarus, Europe, haplotype, *mtCytb*, karyology, refugium, settlement.

Дата поступления в редакцию: 02 сентября 2022 г.

В. В. Карманова^{1,3}, Т. Г. Шабашова¹, М. Г. Синявская², Ю. Г. Гигиняк³

МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ МИКРОМИЦЕТОВ СЛУЖЕБНО-ЖИЛЫХ МОДУЛЕЙ СТАНЦИЙ «ГОРА ВЕЧЕРНЯЯ» И «МИРНЫЙ» (ВОСТОЧНАЯ АНТАРКТИДА)

¹Институт экспериментальной ботаники имени В. Ф. Купревича НАН Беларуси
Республика Беларусь, 220072, г. Минск, ул. Академическая, 27
e-mail: veronikarmanova@gmail.com

²Институт генетики и цитологии НАН Беларуси
Республика Беларусь, 220072, г. Минск, ул. Академическая, 27

³Научно-практический центр НАН Беларуси по биоресурсам
Республика Беларусь, 220072, г. Минск, ул. Академическая, 27

В результате микологического исследования служебно-жилых модулей белорусской станции «Гора Вечерняя» и российской станции «Мирный» выявлено 9 видов микромицетов, принадлежащих к 7 родам отдела Ascomycota. Для определения видовой принадлежности применялись анатомо-морфологические и молекулярно-генетические методы. Большинство обнаруженных видов — это микромицеты с конидиальным спороношением. Доминирующими являются виды *Aspergillus niger* и *Orbicula parietina* (первая находка для Антарктиды). Виды *Geotrichum candidum*, *Aspergillus niger* и *Cladosporium cladosporioides* могут представлять опасность для здоровья человека, при определенных условиях (чаще всего при сильном иммунодефиците, метаболических и гормональных нарушениях, травматических повреждениях кожи и слизистых) вызывая геотрихозы, аспергиллезы и феогифомикозы соответственно. Определены температурозависимые особенности роста: установлено, что большинство выделенных микромицетов являются мезофильными организмами.

Ключевые слова: антарктические микромицеты, микобиота полярных станций, станция «Гора Вечерняя», психрофилия, экстремофильные микромицеты, аллергенные микромицеты.

Введение

Антарктида представляет собой относительно свободный от антропогенной нагрузки регион. Однако в результате возрастающей человеческой деятельности на материке происходит модификация микобиоты как в окрестностях исследовательских станций, так и внутри них. Споры грибов могут попадать в служебные и жилые модули станций вместе с продуктами питания и строительными материалами. А ненадлежащие санитарные условия помещений благоприятствуют развитию привнесенных микромицетов.

Отмечается, что экстремальные антарктические условия вызывают иммунодепрессивные состояния у полярных исследователей, что может приводить к увеличению риска развития инфекционных заболеваний, аллергий и аутоиммунных расстройств. Микромицеты и их метаболиты могут вызывать микозы, а также провоцировать развитие аллергических реак-

ций. По разным оценкам, от 6 до 15% всего населения планеты сенсibilизированы к микромицетам. В этой связи для улучшения качества жизни и работы человека в Антарктиде необходим контроль численности условно-патогенных, токсигенных и аллергенных грибов.

Исследования помещений арктических станций показали, что в аэромикоте наиболее часто встречаются виды *Aspergillus niger*, *Aureobasidium pullulans*, *Cladosporium cladosporioides*, *Penicillium aurantiogriseum* и *P. canescens* [1], а на различных материалах внутри помещений (стены, потолок, мебель) преобладают *Penicillium expansum*, *P. brevicompactum*, *P. herquerei*, *P. purpurogenum*, *P. waksmanii* и *Cladosporium cladosporioides* [2]. При этом доля условно-патогенных видов для аэромикоты составила 65% [1], а для предметов внутри помещений — 87% [2]. В другой работе изучалась микобиота помещений арктических и антарктических станций.

Было установлено преобладание таких видов, как *Alternaria alternata*, *Aspergillus niger*, *Cladosporium cladosporioides*, *Geomyces pannorum*, *Penicillium aurantiogriseum*, *P. chrysogenum*, *P. lanosum*, *P. spinulosum*, *Rhodotorula sp.* [3]. Следует отметить, что исследования микобиоты полярных станций проводятся в основном в районе Арктики, в то время как микобиоте антарктических станций уделяется значительно меньше внимания.

Регулярный контроль численности и разнообразия микромицетов в служебных и жилых модулях антарктических станций необходим не только для снижения риска микогенной сенсибилизации полярников, но и для выявления закономерностей формирования микобиоты полярных помещений, а также оценки ее влияния на микобиоту материка в целом. Не ис-

ключено, что служебно-жилые модули могут быть источником распространения микромицетов за пределы исследовательских станций Антарктиды [1].

Материалы и методы

В рамках работы был выполнен микологический анализ 17 образцов пыли, изолированных из жилых модулей белорусской антарктической станции «Гора Вечерняя» (67°39'35" ю. ш., 46°09'18" в. д., оазис Холмы Тала, Земля Эндерби) (рис. 1) [2] и 5 образцов обоев из модулей российской станции «Мирный» (66°33'20" ю. ш., 93°00'11" в. д.).

Микробиологические методы идентификации грибного разнообразия включали прямой посев фрагментов субстрата на питательную среду (картофельный агар с дрожжевым экс-

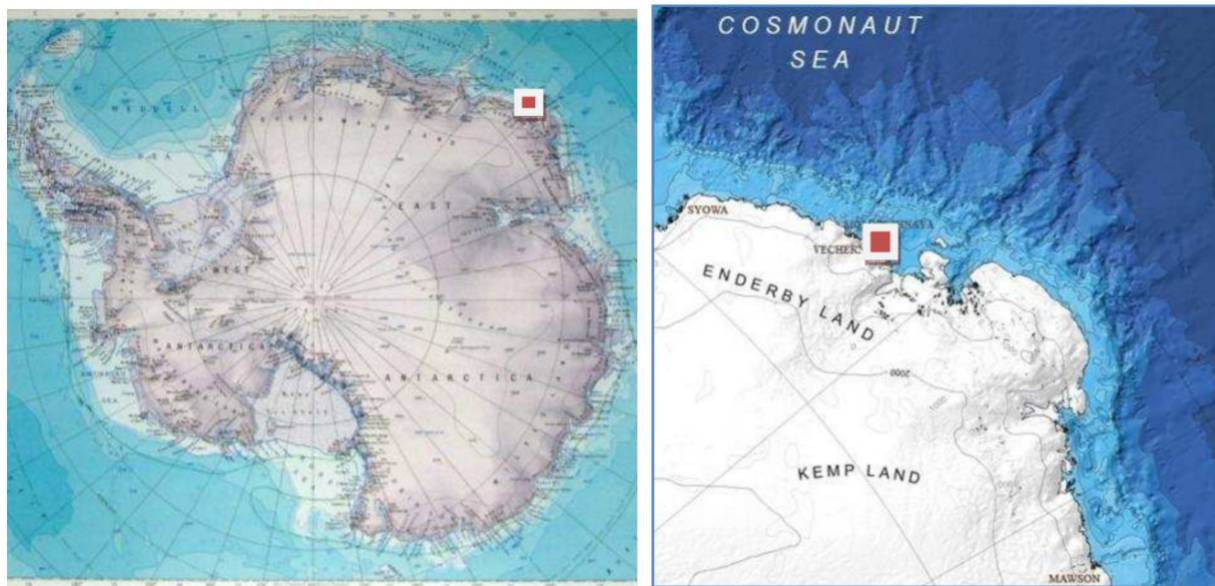


Рис. 1. Расположение белорусской антарктической станции «Гора Вечерняя»

трактом) в трехкратной повторности с последующим культивированием образцов в разных температурных условиях (4 °С, 18 °С и 25 °С) [3]. Видовая принадлежность устанавливалась после изучения анатомо-морфологических особенностей выделенных штаммов с помощью микроскопа Olympus и определителей [4–9]. Методика приготовления КА с дрожжевым экстрактом: 200 г очищенных клубней картофеля кипятили в 1 л воды на протяжении 15 мин. Полученный отвар распределяли в предварительно простерилизованные кол-

бы по 250 мл. Для получения 3% среды в колбу добавляли 7,5 г агара. Дрожжевой экстракт добавляли в количестве 3 г на колбу.

Для выделения грибной ДНК использовался протокол с 5% Chelex [10].

Для проведения амплификации использовалась ПЦР-смесь следующего состава: 2 мкл грибной ДНК (50–100 нг); 7,5 мкл готовой смеси ArtMix (АртБиоТех); 5 pmol прямого праймера ITS1 (5' TCC GTAGGT GAA CCT GCG G '3) (Праймтех); 5 pmol мкл обратного праймера ITS4 (5' TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC '3)

(Праймтех); 3,5 мкл воды.

Амплификация проводилась в термоциклере С1000 (BioRad) в объеме 15 мкл по следующему режиму: 95 °С — 2 мин (1 цикл), 40 циклов: 95 °С — 10 сек, 58 °С — 15 сек, 67 °С — 15 сек (1 цикл), 12 °С — до остановки.

Разделение продуктов амплификации проводилось в 2% агарозном геле с использованием 1хТАЕ-буфера, окрашивание бромистым этидием. Визуализация результатов электрофореза осуществлялась на приборе Gel Doc XR (BioRad).

Переочистка продуктов ПЦР для проведения сиквенсовой реакции осуществлялась с помощью экзонуклеазы I (Ехo I) и рекомбинантной щелочной фосфатазы (rSAP), согласно рекомендации производителя (Thermo Fisher).

Определение последовательности ДНК проводилось по методу Сэнгера. Сиквенсовая

реакция проводилась с набором BrilliantDye Terminator v3.1 (Nimagen) по протоколу от фирмы производителя.

Подготовленный и высушенный фрагмент ДНК растворялся в формамиде и отдавался в центр «Геном» Института генетики и цитологии НАН Беларуси для секвенирования на приборе ABI 3100 Genetic Analyser. Полученные нуклеотидные последовательности анализировались с помощью программ Finch TV и Chromas, BLASTn.

Результаты и их обсуждение

В результате исследования было выделено 25 штаммов микромицетов, относящихся к 9 видам отдела Ascomycota, большинство из которых — микромицеты с конидиальным спороношением (табл. 1). Выявленные микромицеты демонстрируют температуро-

Таблица 1

Видовой разнообразие микромицетов, выделенных из служебно-жилых модулей станций «Гора Вечерняя» и «Мирный»

ID образца	Микромицет	Место сбора
Станция «Гора Вечерняя»		
ID1	Нет роста	ЦУБ, кают-компания, на музыкальном центре
ID2	<i>Aspergillus niger</i> Tiegh., <i>Orbicula parietina</i> (Schr.) S. Hughes*	ЦУБ, прихожая, на огнетушителе
ID3	<i>Penicillium chrysogenum</i> Thom, <i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fresen.) G.A. de Vries	ЦУБ, прихожая, на коробе
ID4	<i>Aspergillus niger</i> Tiegh., <i>Orbicula parietina</i> (Schr.) S. Hughes*	ЦУБ, телефонный отсек, под книжной полкой
ID5	<i>Aspergillus niger</i> Tiegh., <i>Orbicula parietina</i> (Schr.) S. Hughes*	ЦУБ, кухонный отсек, напротив посудомойки, на планочке
ID6	Стерильный светлоокрашенный мицелий	ЦУБ, телефонный отсек, на подоконнике
ID7	<i>Penicillium citrinum</i> Thom	ЦУБ, жилой отсек, на телевизоре
ID8	<i>Aspergillus niger</i> Tiegh., <i>Orbicula parietina</i> (Schr.) S. Hughes*	ЦУБ, кают-компания, на тостере
ID9	<i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fresen.) G.A. de Vries	ЦУБ, кухонный отсек, на коробе
ID10	Нет роста	ЦУБ, кухонный отсек, напротив посудомойки, на подоконнике
ID11	<i>Aspergillus niger</i> Tiegh., <i>Orbicula parietina</i> (Schr.) S. Hughes*	ЦУБ, инструментальный отсек, на верстаке
ID12	<i>Geotrichum candidum</i> Link	ЦУБ, на холодильнике
ID13	<i>Aspergillus niger</i> Tiegh., <i>Orbicula parietina</i> (Schr.) S. Hughes*	ЦУБ, около входа в кают-компанию, над календарем
ID14	<i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fresen.) G.A. de Vries	ЦУБ, вход в жилой отсек, над дверью

Окончание таблицы 1

ID образца	Микромицет	Место сбора
ID15	<i>Geotrichum candidum</i> Link	ЦУБ, на аккумуляторе
ID16	<i>Penicillium</i> sp.	ЦУБ, на двери в кают-компанию
ID17	<i>Aspergillus niger</i> Tiegh., <i>Orbicula parietina</i> (Schrad.) S. Hughes*	ЦУБ, кают-компания, на этажерке
Станция «Мирный»		
ID1.0	<i>Heydenia alpina</i> Fresen.*	Фрагменты обоев в служебном помещении станции
ID2.0	<i>Ramularia</i> sp.*	
ID3.0	<i>Heydenia alpina</i> Fresen.*	
ID4.0	<i>Heydenia alpina</i> Fresen.*	
ID5.0	<i>Heydenia alpina</i> Fresen.*	

Примечание. * — ДНК-идентификация проведена путем секвенирования по Сэнгеру

зависимые особенности роста. Подавляющее большинство обнаруженных видов грибов являются мезофильными, с температурным оптимумом 25–30 °С. Так, при культивировании в термостате (20–28 °С) наблюдается активный рост микромицетов из родов *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium* и *Geotrichum*. При культивировании образцов при комнатной температуре и в холодильнике (3–5 °С) формируются колонии *Orbicula parietina*, *Heydenia alpina*, *Ramularia* sp., *C. cladosporioides* (рис. 2). Среди обнаруженных видов — *Aspergillus niger*, *Geotrichum candidum* и *Cladosporium cladosporioides* могут представлять опасность для здоровья человека. *A. niger* способен расти в широком диапазоне температур от 6 °С до 47 °С (оптимум 35–37 °С). На сегодняшний день *A. niger* не выделяется как возбудитель микозов и микоаллергезов у человека. Однако имеются данные о способности *A. niger* вызывать легочные инфекции (аспергиллезы) у людей с тяжелым иммунодефицитом. Также сообщалось, что в тропических регионах *A. niger* вызывает инфекции уха (отомикозы) при его попадании в наружный слуховой проход. Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США *A. niger* классифицирован как GRAS (Generally Recognized As Safe) [12].

Geotrichum candidum представляет собой сапрофитные дрожжи, колонизирующие кожу, дыхательные пути и пищеварительный тракт человека. Данный вид растет при температурах от 5 до 38 °С (оптимум 25 °С). *G. candidum*

способен вызывать оппортунистические микозы (геотрихозы) у людей с ослабленным иммунитетом [13].

Cladosporium cladosporioides — это космополитный, сапрофитный вид, наиболее часто выделяемый из почвы, воздуха и растительного материала. *C. cladosporioides* растет в широком диапазоне температур (от –5 до +35–37 °С) с оптимумом 18–28 °С. Способен вызывать оппортунистические микозы (феогифомикозы). Феогифомикозы — это микозы, вызываемые темнопигментированными микромицетами (*Phialophora*, *Cladophialophora*, *Exophiala*). Однако данный вид, как *A. niger* и *G. Candidum*, представляет опасность только для лиц с ослабленным иммунитетом или тяжелым иммунодефицитом.

Особый интерес представляет вид *Orbicula parietina* — это сумчатый сапрофитный космополитный вид, обнаруживаемый на различных субстратах природного (почва, растения) и промышленного (пластик, бетон, бумага) происхождения. Долгое время вид *O. parietina* занимал неопределенное положение в отделе Ascomycota, так как он имеет очень тонкие, быстро исчезающие сумки (аски) (рис. 3), которые долгое время не удавалось обнаружить. В 2005 году был проведен молекулярный анализ LSU и LSU рДНК, показавший, что *O. parietina* относится к семейству *Pyrenomataceae* (порядок *Pezizales*) [14]. Согласно литературным данным, *O. parietina* относится к психрофильным микромицетам, что подтверждается в нашем исследовании, поскольку данный гриб растет

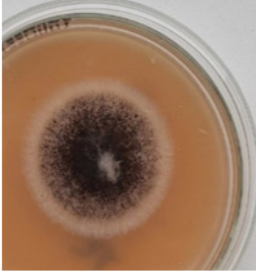
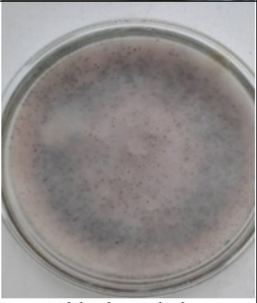
№ 4	4 °C	18 °C	25 °C
7 дней	Роста нет	Роста нет	
10 дней			
14 дней	 Orbicula parietina	 Orbicula parietina	 Aspergillus niger

Рис. 2. Культивирование микромицетов, выделенных из пробы пыли ID4, в разных температурных условиях



Рис. 3. 8-споровые аски *Orbicula parietina*

в диапазоне температур от 4 °С до 18 °С, вместе с этим наиболее интенсивное образование колоний наблюдается, когда культивирование происходит при более низких температурах. Данный штамм был впервые выделен для микофлоры Антарктиды.

В результате молекулярно-генетического анализа из культурального образца была получена нуклеотидная последовательность, которая на 100% идентична ITS-району гриба *Orbicula parietina* (MH855303.1) из Blast (рис. 4) [11].

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
826 bits(447)	0.0	447/447(100%)	0/447(0%)	Plus/Minus
Query 1	TCGCCATTGAATTTTCAAGAGGATTCCAATAAATTGGCTTCCATCTCCAAGACCAAGCAA	60		
Sbjct 471	TCGCCATTGAATTTTCAAGAGGATTCCAATAAATTGGCTTCCATCTCCAAGACCAAGCAA	412		
Query 61	TAGGTAAACCTAAGCTTGAGTGATTTTAATGACGCTCGAACAGGCATGCCTCCCGGAATA	120		
Sbjct 411	TAGGTAAACCTAAGCTTGAGTGATTTTAATGACGCTCGAACAGGCATGCCTCCCGGAATA	352		
Query 121	CCAGGAGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTTCGATGATTCACTGAATTCGCAATTCACACT	180		
Sbjct 351	CCAGGAGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTTCGATGATTCACTGAATTCGCAATTCACACT	292		
Query 181	ACTTATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCGAGAACCAGAGATCCGTTGTTGAAA	240		
Sbjct 291	ACTTATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCGAGAACCAGAGATCCGTTGTTGAAA	232		
Query 241	GTTTTAAAGTTTATGTATAAACAATATTTCAGACAAAATTCaaaaaaaCAGAGTTTATAA	300		
Sbjct 231	GTTTTAAAGTTTATGTATAAACAATATTTCAGACAAAATTCAAAAAACAGAGTTTATAA	172		
Query 301	TTACCTCCCGTGAGCACTCCCCAACAGCTGTTCTTAAAAACAGCGCCAGAGGGAAC TTGC	360		
Sbjct 171	TTACCTCCCGTGAGCACTCCCCAACAGCTGTTCTTAAAAACAGCGCCAGAGGGAAC TTGC	112		
Query 361	GTTTACAGTCTCACGAAAGCAACAGGTAGAAATACGCAGATTGGGTTTACAGAAGATTAA	420		
Sbjct 111	GTTTACAGTCTCACGAAAGCAACAGGTAGAAATACGCAGATTGGGTTTACAGAAGATTAA	52		
Query 421	TTCTATATTTTTTAATGATCCTTCCGC	447		
Sbjct 51	TTCTATATTTTTTAATGATCCTTCCGC	25		

Рис. 4. Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей неизвестного культурального образца и образца MH855303.1 (*Orbina parietina*) из Blast

Заключение

С помощью анатомо-морфологических и молекулярно-генетических методов выявлено 9 видов микромицетов из 7 родов отдела Ascomycota. Большинство обнаруженных видов — это анаморфы сумчатой стадии микромицетов отдела Ascomycota. Следует отметить, что микобиота служебно-жилых модулей формируется в основном за счет космополитных инвазивных видов, связанных с человеческой деятельностью. В результате микологического анализа было выявлено, что в служебно-жилых модулях станции «Гора Вечерняя» преобладают мезофильные микромицеты, растущие в диапазоне от 5–10 °С до 38 °С (оптимум 25–30 °С). Исключение составляют виды *O. parietina*, *Heydenia alpina* и *Ramularia sp.*, формирующие колонии при 5–18 °С.

В микобиоте станции «Гора Вечерняя» присутствуют условно-патогенные и токсигенные виды. *Geotrichum candidum*, *Aspergillus niger* и *Cladosporium cladosporioides* могут представлять опасность для людей с ослабленным иммунитетом, вызывая геотрихозы, аспергиллезы и феогифомикозы соответственно [15].

Вид *Orbicula parietina* (Schröd.) S. Hughes впервые отмечен для Антарктиды.

Список использованных источников

1. Кирцидели, И. Ю. Почвообитающие микроскопические грибы в экосистемах Арктики и Антарктики: дис. ... докт. биол. наук: 03.02.12 / И. Ю. Кирцидели. — СПб, 2019. — 459 с.
2. Власов, Д. Ю., Тешебаев, Ш. Б., Зеленская, М. С. Микологическое поражение материалов в помещениях как фактор риска

- для здоровья полярников / Д. Ю. Власов, Ш. Б. Тешебаев, М. С. Зеленская, И. Ю. Кирцидели, Ю. В. Рябушева // Гигиена и санитария. – 2019. – Т. 98. – № 1. – С. 17–21.
3. Кирцидели, И. Ю., Власов, Д. Ю., Баранцевич, Е. П. Микроскопические грибы в воздушной среде Арктических и Антарктических станций / И. Ю. Кирцидели, Д. Ю. Власов, Е. П. Баранцевич // Успехи медицинской микологии. – 2014. – Т. 13. – С. 59–61.
4. Билай, В. И. Методы экспериментальной микологии: справочник / В. И. Билай [и др.]; под общ. ред. В. И. Билай – Киев: Навукова думка, 1982. – 233 с.
5. Билай, В. И., Курбацкая, З. А. Определитель токсинообразующих грибов / В. И. Билай, З. А. Курбацкая – Киев: Навукова думка, 1990. – 236 с.
6. Билай, В. И., Коваль, Э. З. Аспергиллы / В. И. Билай, Э. З. Коваль – Киев: Наукова думка, 1988. – 204 с.
7. Литвинов, М. А. Определитель микроскопических почвенных грибов / М. А. Литвинов – Л.: Наука, 1967. – 303 с.
8. Domsch, K. H., Gams, W., Anderson, T.-H. Compendium of soil fungi 2nd ed. / K. H. Domsch, W. Gams, T.-H. Anderson. – Germany: IHW-Verlag Eching, 2007. – 672 p.
9. Search Index Fungorum [Electronic resource] / Index Fungorum.org / – Mode of access: <http://www.indexfungorum.org/names/Names.asp>. – Date of access: 16.08.2022.
10. Hirata, T., Takamatsu, S. Nucleotide diversity of rDNA internal transcribed spacers extracted from conidia and cleistothecia of several powdery mildew fungi / T. Hirata, S. Takamatsu // Mycoscience. – 1996. – Vol. 37. – № 3. – P. 283–288.
11. BLAST [Electronic resource]. National Center for Biotechnology Information. Mode of access: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> – Date of access: 16.08.22.
12. Schuster, E. S. On the safety of *Aspergillus niger* – A review / E. S. Schuster // Applied Microbiology and Biotechnology. – 2002. – Vol. 59. – P. 426–435.
13. Eliskases-Lencher, F. Yeasts and molds. *Geotrichum candidum* / F. Eliskases-Lencher [et al.] // Encyclopedia of Dairy Sciences (Second Edition). – 2011. – Vol. 2. – P. 1 229–1 234.
14. Galan, R., Oltra, M. *Orbicula parietina* (Pezizales) un curioso ascomicete con apariencia de mixomicete / R. Galan, M. Oltra // Bol. Soc. Micol. – 2011. – Vol. 35. – P. 17–23.
15. Леонтьев, Д. В. Медицинская микология с основами микотоксикологии. Учебник для высших учебных заведений / Д. В. Леонтьев [и др.]; под ред. Д. В. Леонтьева – Харьков: Запорожский Национальный Медицинский университет, 2010. – 142 с.

V. V. Karmanova^{1,3}, T. G. Shabashova¹, M. G. Sinyavskaya², Yu. G. Giginyak³

MOLECULAR BIOLOGICAL STUDY OF MICROMYCETES AT SERVICE AND LIVING MODULES OF THE STATIONS "MOUNT VECHERNYAYA" AND "MIRNY" (EAST ANTARCTICA)

¹V. F. Kuprevich Institute of Experimental Botany of the National Academy of Sciences of Belarus
27 Akademicheskaya St., 220072 Minsk, Republic of Belarus
e-mail: veronikarmanova@gmail.com

²Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus
27 Akademicheskaya St., 220072 Minsk, Republic of Belarus

³Scientific and Practical Center of the National Academy of Sciences of Belarus for Bioresources
27 Akademicheskaya St., 220072 Minsk, Republic of Belarus

As a result of the mycological study of the service and living modules of the Belarusian station "Mount Vechernyaya" and the Russian station "Mirny", 9 species of micromycetes were identified, belonging to 7 genera of the Ascomycota phylum. To determine the affiliation of species, anatomo-morphological and molecular genetic methods were used. Most of the found species are micromycetes with conidial sporulation. The dominant species are *Aspergillus niger* and *Orbicula parietina* (the first find for Antarctica). The species *Geotrichum candidum*, *Aspergillus niger* and *Cladosporium cladosporioides* can pose a danger to human health under certain conditions (most often with severe immunodeficiency, metabolic and hormonal disorders, traumatic injuries of the skin and mucous membranes), causing geotrichosis, aspergillosis and pheoglyphomycosis respectively. The temperature-dependent features of growth were determined: it was found that most of the isolated micromycetes are mesophilic organisms.

Keywords: antarctic micromycetes, mycobiota of polar stations, Mount Vechernyaya station, psychrophilia, extremophilic micromycetes, allergenic micromycetes.

Дата поступления в редакцию: 06 сентября 2022 г.

О. М. Люсиков¹, И. С. Гордей¹, В. Е. Шимко¹, О. С. Матиевская¹, С. И. Гордей², И. В. Сацюк²

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ УСТОЙЧИВОСТИ ОЗИМОЙ ПШЕНИЦЫ (*TRITICUM* L.) К НИЗКОТЕМПЕРАТУРНОМУ СТРЕССУ

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

²РУП «Научно-практический центр НАН Беларуси по земледелию»
Республика Беларусь, 222160, Жодино, ул. Тимирязева, 1

В обзорной статье изложены современные представления о молекулярно-генетических основах устойчивости озимой пшеницы (*Triticum* L.) к низкотемпературному стрессу. Описаны основные сигнальные пути и идентифицированные гены устойчивости. Показана актуальность разработки специфических молекулярных маркеров, ассоциированных с устойчивостью к низкотемпературному стрессу, для использования в селекции.

Ключевые слова: пшеница, низкотемпературный стресс, морозостойкость, холодостойкость, зимостойкость, ICE-CBF-COR каскад, факторы транскрипции, молекулярные маркеры.

Введение

Климатические и почвенные условия обитания наиболее существенным образом формируют границы и качество ареалов географического распространения и эффективного возделывания сельскохозяйственных культурных растений. Отклонения от диапазона оптимальных внешних условий среды, к которым виды приобрели адаптацию в процессе эволюции, представляют собой стресс, ограничивающий рост и развитие растений или вызывающий полную / частичную их гибель за пределами нормы реакции. Важнейшее значение имеют амплитуда, длительность и интенсивность воздействия стрессового фактора: кратковременные колебания условий внешней среды редко носят характер катаклизма и обычно не приводят к гибели популяции, в то время как длительные системные воздействия (изменения климата, химические изменения состава атмосферы, почв и др.) зачастую коренным образом меняют видовой состав огромных территорий.

Для абсолютного большинства культурных растений основным системным фактором внешней среды, определяющим их продуктивность и стабильную урожайность, является температура, в частности, нижние ее зна-

чения в областях возделывания. Температура оказывает существенное влияние на метаболизм организмов, и в этом смысле переохлаждение считается критическим состоянием окружающей среды [1]. Низкая сезонная температура традиционно является одним из главных ограничивающих факторов выращивания озимой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) в средних и более высоких широтах, а создание зимостойких сортов, соответственно, важнейшей селекционной задачей [2].

Сейчас в связи с глобальным потеплением в сельскохозяйственном производстве в умеренных климатических зонах появляются ранее нехарактерные теплолюбивые виды и сорта растений. Тем не менее на фоне среднегодового повышения температур в данных зонах возросла и амплитуда температурных колебаний, и в будущем прогнозируются аномально холодные зимы с резкими перепадами температур и периодическим недостатком снежного покрова. Поэтому для генетики и селекции растений, в том числе и озимой пшеницы, актуальность проблемы толерантности к низкотемпературному стрессу не только сохранилась, но и возрастает [3]. К примеру, возник запрос на исследование холодо- и морозоустойчивости закаленных (прошедших

холодовую акклимацию) сортов в условиях высокоамплитудных колебаний температур в течение вегетационного периода [1].

Обязательным условием для обеспечения высоких урожаев в районах с низкими сезонными значениями температур является определение, маркирование и введение эффективных аллелей холодо- и морозостойкости в элитные сорта озимой пшеницы [4]. С целью определения наиболее перспективных направлений для разработки эффективных маркеров холодо- и морозостойкости в настоящей статье приведен обзор современных представлений о молекулярно-генетических основах устойчивости озимой пшеницы к низкотемпературному стрессу.

Изменения экспрессии генов пшеницы в ответ на низкотемпературный стресс

Зимостойкость растений включает разные аспекты устойчивости к низкотемпературному стрессу (Low temperature tolerance, LT), в частности: устойчивость к холоду (Cold tolerance, CT), адаптацию к низким положительным температурам от +18 / +15 до 0 °C и морозостойкость (Frost tolerance, FT), адаптацию к низким отрицательным температурам ниже 0 °C [5]. Для зимостойких растений характерна также потребность в яровизации и закаливании [6].

Общей реакцией растений на снижение температуры является термодинамическое замедление кинетики метаболических реакций, изменение химического состава и физических свойств компонентов клеток и тканей, изменения транскрипционного профиля, регуляции и экспрессии многих генов, синтез специфических белков и метаболитов, накопление криопротекторов и включение антифризных систем, повышающих температурный порог образования льда.

В настоящее время у растений обнаружено множество белков холодового ответа с известными функциями, повышающих концентрацию или синтезирующихся в ответ на низкотемпературное воздействие и относящихся к различным классам: COR (cold responsive / cold regulated, чувствительные к холоду / регулируемые холодом), KIN (cold and ABA induced), LT (low temperature, низкотемпературные), LTI (low temperature induced, индуцируемые низкой температурой), LTS (low

temperature specific, специфических для низкой температуры), LEA (late embryogenesis abundant [proteins], обильные [белки] позднего эмбриогенеза), DHN (dehydrins, дегидрины), RD (responsive to dehydration, чувствительные к дегидратации), ERD (early responsive to dehydration, раннего распознавания дегидратации), RAB (responsive to abscisic acid, чувствительные к абсцизовой кислоте), CSDP (cold shock domain protein, белок с доменом холодового шока), аквапорины и прочие подобные.

Важнейшее значение в холодо- и морозостойкости растений играют специфические ферменты и фитогормоны, регулирующие различные физиологические процессы. К ним относятся абсцизовая (ABA), гибберелловая (GA) и жасминовая (JA) кислоты, метилжасмонат (MeJA), брассиностероиды (BR), этанол (ETH), ауксин и пр. [7]. Абсцизовая кислота (АБК) является главным стрессовым гормоном растений, в том числе основным положительным регулятором устойчивости к гипотермальному стрессу. Она регулирует замыкание устьиц, стабилизирует структуру мембран, контролирует осмотический баланс и толерантность растений через регуляцию транскрипции нижестоящих генов [5, 7]. Фактически все адаптивные реакции растений на снижение температуры контролируются как в гормон-зависимых, так и в гормон-независимых регуляторных цепях.

Холодовая адаптация растений связана со значительным изменением регуляции и экспрессии сотен или тысяч генов в период акклимации [5, 8–10], а в условиях последующих заморозков подключаются дополнительные генетические системы [11]. При этом активизируются и регуляторные гены, подавляющие экспрессию систем вегетации.

Так, профилирование транскриптома *Arabidopsis thaliana* позволило установить 2 637 холодочувствительных генов COR (в том числе 1 297 активируемых и 1 427 репрессируемых холодом) [12]. Похожие исследования, проведенные на двух генотипах ячменя, контрастно различающихся по признаку морозостойкости, позволили выявить 6 474 гена, дифференциально экспрессируемых при низкотемпературном стрессе [13]. У мягкой пшеницы, имеющей один из самых больших известных геномов (124 тыс. генов / 17 млрд

нуклеотидов), RNA-Seq анализ профилей транскриптома выявил 29 066 дифференциально экспрессируемых генов в листьях после акклимации к холоду по сравнению с контролем, не прошедшим закалывания. Из них 745 генов активировались только при отрицательных значениях температур [5].

Для активации определенных генов неблагоприятный фактор должен сформировать специфический сигнал в клетке, способный восприниматься ее рецепторами и передаваться далее по цепи мессенджеров, приводя в конечном итоге к адаптивному ответу на абиотический стресс [14]. Механизмы восприятия растением сигнала низкотемпературного стресса и его трансдукции в генетический аппарат клетки пока до конца не изучены. Предполагается, что первичным сигналом являются изменение текучести (вязкости) биологических мембран, изменение конформации и денатурация белков и нуклеиновых кислот, деполимеризация элементов цитоскелета, изменение концентраций различных метаболитов и уровня фитогормонов, сезонные колебания освещенности и циркадные ритмы [3, 15]. Температурными сенсорами при этом выступают механочувствительные кальциевые каналы (Ca^{2+}). В восприятии и передаче сигнала участвуют и другие вторичные рецепторы: фосфолипиды, АФК и инозитол-3-фосфат (IP_3) [14, 15].

Наиболее изучена рецепция сигнала низкотемпературного стресса посредством кальциевых каналов. Холод приводит к затверждению липидной части мембран, что вызывает перестройку цитоскелета, а также индукцию чувствительных к натяжению мембраны кальциевых каналов и входу ионов кальция (Ca^{2+}) из апопласта в цитозоль клетки [16, 17]. Далее происходит связывание ионов кальция со специфическими Ca^{2+} -связывающими белками (CBPs): кальмодулинами (CaM), кальмодулин-подобными белками (CML), кальциневрин B-подобными белками (CBL, calcineurin B-like), кальций-зависимыми протеинкиназами (CDPK, calcium-dependent protein kinases). Белки CBPs, после связывания с ионами кальция, претерпевают конформационные изменения, которые позволяют им активировать или инактивировать целевые белки. Так, CaM связываются с кальмодулин-связывающим фактором транскрипции (CAMTA),

CBL — с CBL-взаимодействующими протеинкиназами (CIPK, CBL-interacting protein kinases), CDPK — с митоген активируемыми протеинкиназами MAPK (mitogen activated protein kinases). Далее эти нижестоящие эффекторы инициируют серию событий, приводящих к обширному перепрограммированию экспрессии генов [13]. Например, CBL и CDPK активируют каскады фосфорилирования белков, включающие каскады протеинкиназ CIPK и MAPK, контролирующих, в свою очередь, транскрипцию генов, метаболизм и подвижность клеток [14]. Повышение уровня ионов кальция в цитоплазме также генерирует сигнал для специфического мембранного рецептора COLD1/RGA1, который является посредником при передаче гормональных сигналов от рецепторов клеточной мембраны к эффекторным белкам, вызывающим конечный ответ на низкотемпературный стресс [18].

Также имеются данные о роли некоторых ферментов в восприятии снижения температуры: НАДФН-оксидазы в плазматической мембране (генерирующей супероксидный анион-радикал), фосфолипиды D (катализирующей образование фосфатидной кислоты), гистидинкиназы Hik33 (цианобактерии). Однако однозначных представлений о последовательности событий при восприятии сигнала гипотермии в растительной клетке пока нет [3, 19, 20].

Если рецепцию сигнала можно считать наиболее специфичным этапом развития адаптивной реакции на абиотический фактор, то передача сигнала и в особенности регуляция экспрессии генов намного сложнее.

Центральную роль в передаче сигнала и регуляции экспрессии генов на абиотический стресс играют транскрипционные факторы (TF) — белки со специфическим ДНК-связывающим доменом, при взаимодействии которого с комплементарными цис-элементами в промоторах целевых генов происходит регуляция их экспрессии. Действие факторов транскрипции достаточно специфично, а круг генов-мишеней широк [14]. Сегодня известно более 40 семейств транскрипционных факторов, участвующих в передаче сигналов и регуляции ответа на снижение температуры.

Наиболее значимым в контроле устойчивости к низкотемпературному стрессу и в настоящее время наиболее изученным является

ICE–CBF–COR сигнальный путь (регуляционный каскад), реагирующий также на сигналы растительных гормонов, циркадных ритмов и освещенности. Он включает несколько вертикально сопряженных регулонов транскрипционных факторов (ICE, CBF) и обнаружен у пшеницы, риса, чая и других видов [15, 21].

Основными индукторами ICE–CBF–COR сигнального пути являются белки ICE (inducer of CBF expression, индукторы экспрессии CBF) — позитивные факторы транскрипции генов *CBF / DREB* (C-repeat binding factor, фактор связывающий С-повтор / dehydration responsive element binding, реагирующий на обезвоживание связывающий элемент). В свою очередь, белки генов *CBF* регулируют экспрессию генов *COR* (cold responsive) играющих важную роль в адаптации растений к низкотемпературному стрессу.

Белки ICE представляют собой пептиды размером около 500 аминокислотных остатков и обнаружены у многих видов растений. У пшеницы обнаружено 5 *ICE* генов, локализованных на хромосомах 3A, 3B, 3D, 4B и 4D. При нормальной температуре концентрация ICE белков в клетке сбалансирована.

Белки ICE принадлежат к группе факторов транскрипции MYC — подсемейству белков, имеющих на С-конце общий консервативный ДНК-связывающий домен bHLH (basic helix-loop-helix), который имеет два функционально различных мотива. Мотив HLH, богатый гидрофобными остатками, отвечает за димеризацию факторов транскрипции. Основной мотив в N-терминальной части домена состоит из 15 консервативных аминокислот и обуславливает специфичность взаимодействий с ДНК. Он способен связываться с консенсусной последовательностью CANNTG цис-элемента MYC в промоторе генов-мишеней, включая гены *CBF* [22].

Принято считать, что активность белков ICE регулируется их посттрансляционной модификацией — фосфорилированием, убиквитинированием, сумоилированием [23, 24, 25, 26, 27]. Фосфорилирование является одной из наиболее важных посттрансляционных модификаций белков ICE, регулирующих их активность и концентрацию в ответ на низкотемпературный стресс. Оно происходит под действием различных киназ, в частности, OST1

(open stomata 1, открытые устьица 1), BIN2 (Brassinosteroid-Insensitive 2) и SnRK2 (Sucrose Nonfermenting Related Kinase 2), ингибированных при оптимальной температуре. При длительном низкотемпературном стрессе они активируются и фосфорилируют белки ICE, усиливая их активность [26, 28]. Также OST1 взаимодействует с HOS1 (High Expression Of Osmotically Responsive Gene 1, высокоэкспрессирующийся осмотически чувствительный ген 1), препятствуя взаимодействию между HOS1 и ICE, чем подавляет опосредованную HOS1 деградацию белков ICE [26].

Про регулировку активности белков ICE убиквитинированием и сумоилированием известно меньше. Так, показано, что убикитинлигаза PUB25/26 (PUTATIVE U-BOX E3) способствует активации белков ICE, подавляя HOS1 [29]. Также во время холодового стресса PUB25/26 деактивирует фактор транскрипции MYB15, ингибитор каскада ICE-CBF, тем самым увеличивая активность белков ICE [30]. Кроме того, известно сумоилирование белков ICE лигазой SIZ1 (SUMO E3) [23]. Сумоилированная форма белков ICE вытесняет ингибитор MYB15 [30].

Кроме фосфорилирования киназами, убиквитинирования и сумоилирования, известны также и некоторые другие пути регуляции белков ICE. Так, холод активирует синтез эндогенной жасмоновой кислоты, которая запускает деградацию белков JAZ (Jasmonate Zim-Domain), ранее репрессировавших активность белков ICE [31]. Кроме того, описанные выше сенсорные Ca^{2+} -связывающие белки (CBPs) активируют каскады протеинкиназ SIPK и MAPK, которые дерепрессируют белки ICE [14]. Также биоинформационный анализ позволяет предполагать, что в промоторных зонах генов *ICE* есть ряд последовательностей регуляторных цис-элементов связанных с реакцией на абиотический стресс, в частности, в промоторе AtICE1 — мотив CM2, известный как сайт связывания транскрипционного фактора CAMTA3 в ответе на низкотемпературный стресс. Это свидетельствует, что регулировка активности белков ICE может происходить и на уровне транскрипции [27].

Все это в конечном счете приводит к увеличению активности и концентрации белков ICE в клетке, запускающих весь каскад сигнально-

го пути ICE–CBF–COR.

Белки ICE являются факторами транскрипции нижестоящих в каскаде генов *CBF*. Мотив, состоящий из 15 консервативных аминокислот в N-терминальной части на C-конце консервативного ДНК-связывающего домена белка ICE, обуславливает специфичность взаимодействий с ДНК и способен связываться с каноническим цис-элементом MYC в промоторе генов-мишеней *CBF*, регулируя, таким образом, их экспрессию [22].

Семейство генов *CBF* высококонсервативно и обнаружено даже у растений, не способных к холодной акклимации, таких как томат и рис [16]. В частности, гены *CBF* были исследованы у риса (*Oryza sativa* L.) и других зерновых культур, мятлика лугового (*Poa pratensis* L.), исландского мака (*Papaver nudicaule* L.), яблони (*Malus* spp.), сои (*Glycine max* (L.)), миндаля (*Prunus dulcis* Mill.), гречихи (*Fagopyrum esculentum*), эвкалипта (*Eucalyptus gunnii*) и др. У всех этих видов гены *CBF* имеют значительную идентичность последовательностей (~85%) [32].

Общей чертой *CBF* в геномах злаков является организация их в кластеры tandemно дублированных паралогов [13]. Филогенетические исследования 53 видов растений показали, что гены *CBF* более многочисленны, чем гены *ICE*: в базе данных генома пшеницы обнаружено 37 генов *CBF* и всего 5 генов *ICE* [33]. У пшеницы *CBF*-гены локализованы на хромо-

сомах 5A, 5B и 5D. Установлено, что эти гены играют ключевую роль в повышении устойчивости растений к низкотемпературному стрессу [13, 21, 32]. С использованием технологии CRISPR показана генетическая связь между аллельным составом, копийностью и уровнем экспрессии генов *CBF* и устойчивостью к холоду [21].

Роль *CBF*-генов в реакции на снижение температуры состоит в том, чтобы интегрировать ряд стрессовых сигналов и при необходимости инициировать транскрипционный ответ, который позволяет растению повысить его устойчивость к замерзанию [32].

Функции транскрипционных факторов CBF / DREB в интеграции стрессовых сигналов и сетевом контроле реакции растений на стресс обеспечены генетической структурой промоторных участков их собственных генов [34] (рис. 1.), включая:

- Цис-элемент MYC с консенсусной последовательностью CANNTG для связывания с транскрипционными факторами ICE, являющимися основными индукторами экспрессии генов *CBF* [22];
- Цис-элемент MYB для связывания транскрипционного фактора MYB15, являющегося конкурентным ICE-репрессором экспрессии *CBF*-генов [35];
- Цис-элемент CM2 с мотивом CGCG для связывания факторов транскрипции САМТА (кальмодулин-связывающий активатор транс-

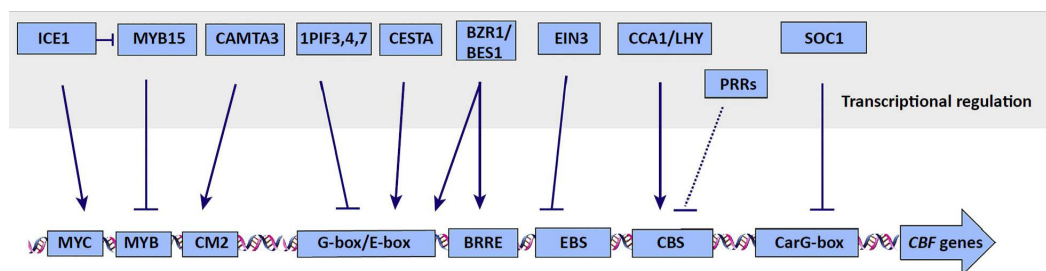


Рис. 1. Структурно-функциональная организация промоторных участков генов транскрипционных факторов CBF / DREB [34]

крипции), которые выступают позитивными регуляторами экспрессии *CBF*-генов, реагируя на повышение концентрации кальция в цитоплазме в ответ на снижение температуры [36, 37];

– Мотивы G- и E-боксов служат для связывания факторов транскрипции PIF, являющихся репрессорами генов *CBF* и играю-

щих центральную роль в опосредованной фитохромом сети, реагирующей на сигналы фоторецепторов PHYB и PHYD (Phytochrome B / D) [38], а также факторов транскрипции CESTA (CES) и BZR1 / BES1, участвующих в передаче фитогормональных сигналов брассиностероидов (BR) и позитивно регулирую-

щих экспрессию *CBF* [39, 40];

- Мотивы EBS служат для связывания транскрипционного фактора EIN3 (ethylene insensitive 3, нечувствительность к этилену 3), ключевого в передаче сигналов этилена (ETH), который негативно регулирует экспрессию *CBF* [34];

- Элемент CBS является сайтом связывания MYB-подобных циркадных факторов транскрипции CCA1 / LHY (circadian clock associated 1 / late elongated hypocotyl) [41];

- CArG-бокс с сайтом связывания с MADS-доменом белка SOC1 (Suppressor Of Constans Overexpression 1), который является негативным фактором транскрипции *CBF* и кодируется геном репрессора цветения FLC (Flowering Locus C) [42].

Также в условиях низкой температуры снижаются уровни ростовых гормонов гиббереллинов (GA), что приводит к накоплению белков DELLA, которые по неизвестному пока полностью механизму способствуют экспрессии генов *CBF*. В частности, DELLA модулируют передачу сигналов брассиностероидов, JA (взаимодействуя с JAZ), EIN3 и PIF [32].

Таким образом, сигнальный путь активации *CBF* объединяет многие внутренние и внешние сигналы, такие как низкая температура, циркадные часы, свет и время цветения. Также многочисленные исследования показали, что экспрессия генов *CBF* регулируется фитогормонами, и в их промоторах были обнаружены цис-элементы, чувствительные к АБК, MeJA, ETH, GA, BR, салициловой кислоте, ауксину [32].

Белки CBF распознают цис-элементы CRT / DRE, локализованные в промоторах *COR*-генов, и играют важную роль в настройке профиля их экспрессии. Однако активация *COR*-белков пшеницы может происходить как по CBF-зависимому, так и по CBF-независимому пути. Также белки COR функционируют как в гормон-независимых (АБК-независимых), так и в гормон-зависимых (АБК-зависимых) путях. АБК-зависимых белков COR относительно меньше и большинство из них являются белками позднего эмбриогенеза LEA и чувствительны также к засухе [33]. Большинство генов *COR* индуцируется факторами CBF и не чувствительны к АБК и, таким образом, принадлежат к CBF-зависимому пути

[33]. Установлено, что именно CBF-зависимый путь играет центральную роль среди множества регуляторных путей устойчивости к низкотемпературному стрессу [16, 37]. По разным оценкам, регуляторный путь ICE–CBF–COR охватывает от 6,5 до 92,0% чувствительного к холоду транскриптома [12, 43–45].

Хромосомная локализация идентифицированных сегодня генов ICE–CBF–COR пути у пшеницы показаны на рисунке 2. В целом у пшеницы пока идентифицировано порядка 60 генов, ассоциированных с повышенной холодоустойчивостью. Важно подчеркнуть, что различия в количестве копий генов *ICE* и *CBF* могут лежать в основе фактических различий в накоплении продуктов *COR*-генов и результирующем уровне морозостойкости между контрастирующими генотипами [46].

Несмотря на то, что ICE–CBF–COR путь считается основным в регуляции LT-устойчивости, перекрестные связи с гормон-опосредованными регуляторными каскадами играют большую роль в толерантности растений к абиотическим стрессам. В частности, индуцируемое стрессами различной природы повышение концентрации АБК приводит к активации транскрипции генов семейства ABF / AREB. Повышенная экспрессия генов *ABF* / *AREB* приводит к повышению устойчивости ко многим типам стресса, в том числе гипотермии. [7]. Белки AREB активируют экспрессию генов-мишеней, кодирующих гидрофильные глицин-богатые белки, которые принадлежат к семейству дегидринов и играют важную роль в защите растений от холодового стресса, обезвоживания и засоления. В передачу АБК-зависимого сигнала также вовлечены Snf1-подобные протеинкиназы. Члены этого семейства белков (SnRK2) активируются АБК, обезвоживанием и повышенной соленостью. Белки SnRK2 активируют транскрипционные факторы, индуцирующие экспрессию генов ответа на осмотический стресс. Snf1-подобные протеинкиназы KIN10 и KIN11 из семейства SnRK1 участвуют в ответе на различные стрессовые воздействия, в том числе и на холод [21].

Еще один путь адаптации растений к низким температурам затрагивает переход между вегетативной и генеративной фазой развития под контролем низкокопийных генов яровизации

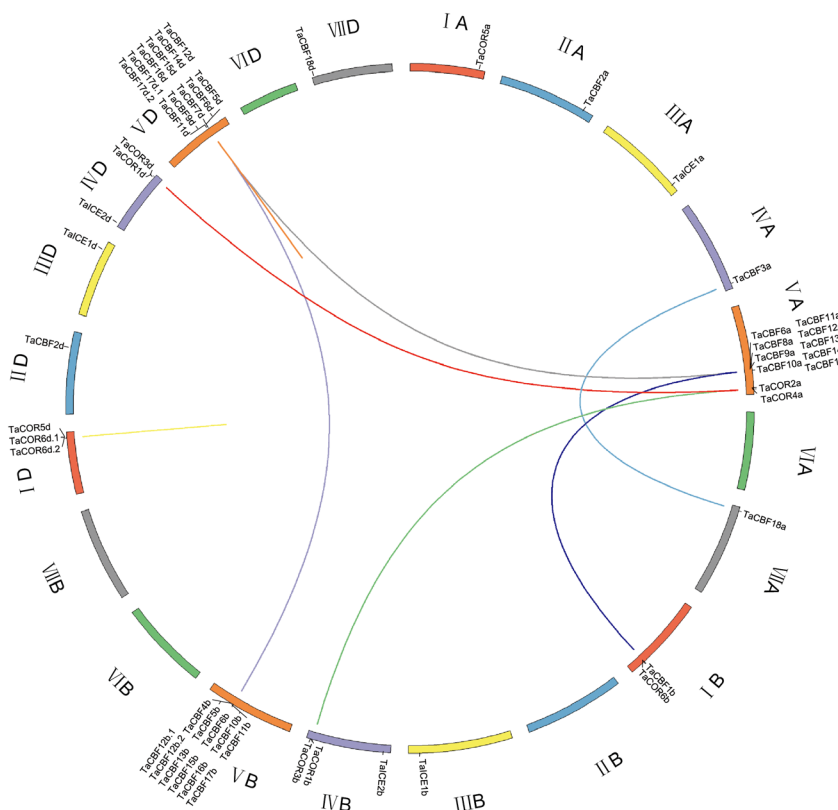


Рис. 2. Хромосомная локализация идентифицированных генов ICE–CBF–COR пути у пшеницы [33]

(VRN) обеспечивающих озимость [7].

У пшеницы потребность в яровизации контролируется пятью генами: *VRN1*, *VRN2*, *VRN3*, *VRN4* и *VRN5*. Первые три были клонированы и охарактеризованы. Гомеологи *VRN1*, *VRN2* и *VRN3* были идентифицированы в трех геномах гексаплоидной пшеницы (геномы A, B и D). Ген *VRN1* кодирует фактор транскрипции — белок MADS box, который, в свою очередь, является негативным фактором транскрипции генов *CBF* и способен снижать уровни экспрессии *CBF* и *COR* в условиях длинного дня. *VRN3* является индуктором цветения, а *VRN2* является репрессором цветения. Предполагаемая роль *VRN2* заключается в подавлении индукции *VRN3* осенью, чтобы предотвратить цветение перед зимой. Ключевая роль непосредственно в контроле яровизации принадлежит *VRN1*. Остальные гены *VRN* в настоящее время пока не клонированы и охарактеризованы недостаточно [47].

Эпигенетический контроль устойчивости пшеницы к низким температурам

В последние годы было обнаружено, что в реакции растений на изменение факторов

окружающей среды, особенно в ответ на абиотический стресс, заметную роль играют эпигенетические процессы [1, 48, 49], основанные на метилировании ДНК, модификации гистонов и РНК-сайленсинге.

Модификации в паттерне метилирования кодирующих областей некоторых чувствительных к стрессу генов регулируют их экспрессию в ответ на изменения температуры, фотопериода, влагообеспечения и др. Обнаружено, что в процессе адаптации к низким температурам в областях ДНК, кодирующих регуляторные элементы (ICE, CBF), индуцировалось гипометилирование. При этом индуцированное холодом метилирование ДНК сильно коррелировало с низкими температурами, но не с генотипом [50, 51].

Модификации гистонов могут играть важную роль в холодовом стрессе у растений; могут происходить с участием ацетилирования, метилирования, убиквитинирования и фосфорилирования N- и C-концевых участков, а также ядер центральных гистонов (H2A, H2B, H3 и H4). Например, высокие уровни ацетилирования гистонов H3 и H4 в промоторах ω -3 FAD коррелировали с биосинтезом жир-

ных кислот, участвующих в поддержании целостности мембран при низкотемпературном стрессе [52].

Малые некодирующие РНК (miRNA, siRNA) также могут вызывать динамические изменения экспрессии генов в ответ на холодовой стресс. Они регулируют транскрипцию кодирующих различных белки генов и воздействуют на эпигенетические пути сайленсинга генов [53]. Также малые РНК модифицируют хроматин в результате РНК-интерференции, что обычно приводит к образованию гетерохроматина и последующему подавлению генов-мишеней. Так, чувствительные к холоду miRNA могут участвовать во многих сигнальных путях, поскольку содержат мотивы LTRE — ответа на низкую температуру и ABRE — ответа на абсцизовую кислоту, то есть участвовать в регуляции как АБК-зависимых, так и АБК-независимых путей [53].

Видимо, в связи с периодическими падениями температур растения выработали стратегии, позволяющие «запоминать» первый стресс и более эффективно реагировать на повторный путем изменений в паттернах экспрессии генов [54]. Возможно, именно в результате формирования «эпигенетической памяти» предварительное закалывание вызывает лучшую толерантность растений к последующему низкотемпературному стрессу [55, 56]. В таком контексте ключевым фактором в приобретении «эпигенетической памяти» является продолжительность воздействия абиотического фактора: кратковременные периодические воздействия оказались менее эффективны в формировании холодостойкости в сравнении с длительным предварительным охлаждением, что еще раз подтверждает формирование «эпигенетической памяти» о холодом стрессе в процессе холодовой акклимации [54].

Таким образом, реакция растений на холод представляется результатом сложной интеграции различных генетических систем между собой на всех уровнях регуляции: транскрипции, трансляции, посттранскрипционных, посттрансляционных, а также эпигенетических механизмов [15]. Перспективным является углубленное изучение генетики холодоустойчивости пшеницы с целью разработки эффективных молекулярных маркеров на данный признак.

Идентификация локусов устойчивости пшеницы к низким температурам

Устойчивость к низким температурам — сложный количественный полигенный признак. Несмотря на сложный генетический контроль, на сегодняшний день выявлен ряд локусов, тесно связанных с признаком. Ассоциативное картирование у пшеницы выявило предполагаемые QTL холодо- и морозостойкости на хромосомах 1A, 1B, 1D, 2A, 2B, 3A, 4B, 5A, 5B, 6A, 6D, 7B [9, 57–59]. Основные QTL (более 40% фенотипических вариаций) идентифицировали на хромосомах 5-ой группы [58]. По разным оценкам, с полиморфизмом в QTL-локусах на хромосомах 5-ой группы связано от 40,0 до 91,6% генотипической дисперсии по признаку морозостойкости [58–61]. Причем дисперсия признака толерантности к низким температурам может быть связана не только с SNP, но и с количеством копий (CNV) тех или иных генов LT-устойчивости в QTL-локусах ассоциированных с признаком. В 2020 г. с использованием 543 образцов пшеницы и высокоплотного 90K Illumina iSelect SNP Array выявлено 63 QTL, включающих 76 значимых SNP, связанных с признаками толерантности к холоду на 18 хромосомах пшеницы (1A, 1B, 1D, 2B, 2D, 3A, 3B, 3D, 4A, 4B, 5A, 5B, 5D, 6A, 6D, 7A, 7B и 7D). Причем 14 значимых SNP были идентифицированы на хромосоме 5A. Фенотипические вариации морозоустойчивости, объясняемые каждым SNP, составляли от 3,83 до 9,38%. Выявленные наиболее значимые локусы SNP и гены-кандидаты, связанные с толерантностью к низким температурам, принадлежали к семейству генов *CBF* [62].

В итоге в настоящее время установлены два главных универсальных QTL морозостойкости пшеницы: FR1 и FR2, расположенные на длинных плечах гомеологичных хромосом 5-ой группы. Кроме того, выявлен дополнительный QTL на хромосоме 5B пшениц из Центральной Европы [63], а также несколько QTL с малым эффектом [61].

QTL FR1 физически и генетически картирован. На хромосоме 5A пшеницы он локализован в области примерно 170 cM. Считается, что участие локуса FR1 в морозостойкости объясняется плейотропным эффектом гена *VRN1*. Поэтому QTL FR1 обозначают обычно как VRN1 [64]. У пшеницы охарактеризованы три гомологичных гена *VRN1* в геномах A, B и D

— *VRN-A1* [65], *VRN-B1* [66] и *VRN-D1* [67]. При этом яровые формы имеют доминантные аллели: *VRN-A1a* / *VRN-B1a* / *VRN-D1a*, а озимые формы имеют рецессивные аллели: *VRN-A1b* / *VRN-B1b* / *VRN-D1b*. Наиболее сильным эффектом обладает *VRN-A1* [68, 69]. По последним оценкам, эффект *VRN-A1* на морозостойкость пшеницы объясняет порядка 2,9% генотипической дисперсии признака. Вариации в значительной мере связаны с различиями в количестве копий (CNV) этого гена, чем значимыми SNP в нем [61, 64].

QTL FR2 картирован примерно в области 111,7 сМ, на 30 сМ проксимальнее FR1 (*VRN1*) на хромосомах группы 5. Он является наиболее важным локусом, связанным непосредственно с морозоустойчивостью, так как включает в себя транскрипционные факторы *CBF* [57, 70, 71]. Так, у мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) QTL FR2 включает 29 из 37 идентифицированных генов *CBF*: 9 — на хромосоме 5A в локусе FR-A2 и по 10 на хромосомах 5B (FR-B2) и 5D (FR-D2) [33].

Локус Fr-A2 был идентифицирован как основной QTL, лежащий в основе морозостойкости твердой пшеницы (*Triticum durum* L.), объясняющий 91,6% генотипической дисперсии признака [60]. У диплоидной пшеницы *Triticum monosocum* локус Fr-A2 несет кластер не менее чем из 11 генов *CBF*. Эффект гомологов подтвержден и у *Triticum aestivum* [71]. Показано, что с SNP и CNV в генах *CBF-A3*, *CBF-A5*, *CBF-A10*, *CBF-A12*, *CBF-A14*, *CBF-A15*, *CBF-A18* связаны различия по признаку морозостойкости [4].

Как предполагается, три соседних гена *CBF-A12*, *CBF-A14* и *CBF-A15*, расположенные в центральном кластере локуса Fr-A2, играют критическую роль в устойчивости к морозу [64, 70, 72]. Так, в исследовании, проведенном на материале европейских линий озимой мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.), 208 линий из 407 несли чувствительный к морозу S-гаплотип (FR-A2-S), а 199 — морозоустойчивый T-гаплотип (FR-A2-T). При этом линии с гаплотипом FR-A2-S показали низкое значение сигналов *CBF-A14* и *CBF-A15*, а линии с гаплотипом FR-A2-T имели промежуточное или высокое значение сигналов *CBF-A14* и *CBF-A15*, но низкое и редко промежуточное *CBF-A12* [61]. По результа-

там оценки общей доли генотипической дисперсии в локусе QTL Fr-A2 вклад его в генотипическую изменчивость морозостойкости пшеницы оценивается на уровне 40%, причем на долю CNV *CBF-A14* приходится 24,3% [61]. Стоит отметить, что из трех данных генов именно полиморфизм *CBF-A14* сильнее всего влиял на дисперсию признака морозоустойчивости, так как в присутствии *CBF-A14* полиморфизмы как *CBF-A12*, так и *CBF-A15* практически не объясняли никаких различий в уровне морозостойкости. Так, наименее зимостойкие сорта из Великобритании и Франции имели низкий сигнал, а линии с самой высокой зимостойкостью из Польши показали высокий сигнал *CBF-A14* [60]. Полагают, что число копий *CBF-A14* и частота морозоустойчивого FR-A2-T-гаплотипа отражают климатические условия в странах происхождения генотипов [61]. Скорее всего, гаплотипы FR-A2-S и FR-A2-T связаны с различиями в количестве копий всех трех этих генов *CBF* в центральной области локуса FR-A2 и гаплотип FR-A2-T может быть определен именно как имеющий увеличенное число копий гена *CBF-A14* [60, 61, 64].

Локус Fr-B2, расположенный на хромосоме 5B, также оказывает существенное положительное влияние на морозостойкость. Показано, что делеция нескольких генов этого локуса, *CBF-B12*, *CBF-B14* и *CBF-B15*, связана с пониженной морозостойкостью тетраплоидной (*Triticum durum* L.) и гексаплоидной (*Triticum aestivum* L.) пшениц [72]. Вклад QTL Fr-B2 в зимостойкость оценивается на уровне 4,2% [60].

В итоге на сегодняшний день вклад известных QTL в формирование морозоустойчивости пшеницы определяется в основном как QTL Fr-A2 (SNP + CNV) на уровне 40%, еще порядка 15% приходится на неустановленные полиморфизмы, вклад QTL *VRN-A1* на уровне 2,9 (SNP) — 5,1% (SNP + CNV), около 4,2% способен привнести полиморфизм в QTL Fr-B2 и относительно небольшие вклады QTL в других локусах хромосом разных геномов пшеницы [60, 61, 64].

Поскольку никаких других основных QTL выявлено не было, судя по всему, генетическая архитектура устойчивости к низкотемпературному стрессу у европейских сортов

озимой пшеницы основана на QTL FR-A2, который во взаимодействии с QTL Fr-B2 и VRN1 (FR1) является ключевым компонентом регуляторной сети низкотемпературной акклиматизации пшеницы [61, 64]. В регионах с более суровыми зимами имеет смысл аддитивная селекция по независимым и взаимосвязанным генетическим эффектам локусов FR-A2, Fr-B2 и VRN1 (FR1). Локус Fr-A2 уже сейчас является целью в селекционных программах для повышения морозостойкости.

Сегодня для ряда идентифицированных генов этих локусов разработаны молекулярные маркеры (*VRN-A1* [65, 68], *VRN-B1* [66], *VRN-D1* [67], *Ppd-D1* [73], *CBF-A12/14/15* [61], *Fr-A2-S/T*, *CBF-A14 CNV* [60, 61, 64] и др.). Огромное значение имеет дальнейшая идентификация новых генов, аллелей и разработка эффективных маркеров, ассоциированных с признаками LT-устойчивости.

Заключение

Воздействие низких положительных и отрицательных температур вызывает обширные изменения процессов жизнедеятельности у растений: изменяется транскрипционный профиль, химический состав и физические свойства компонентов клеток и тканей, происходит термодинамическое замедление кинетики метаболических реакций, синтез специфических белков и метаболитов, накопление криопротекторов и включение антифризных систем. Реакция растений на холод представляется результатом сложной интеграции различных генетических систем между собой на всех уровнях регуляции: рецепции и передаче сигнала, транскрипции, трансляции, посттранскрипционных, посттрансляционных, а также эпигенетических механизмов.

Холодовая адаптация пшеницы связана со значительным изменением регуляции и экспрессии сотен или тысяч генов в период акклиматизации. Наиболее значимыми и изученными в генетическом контроле устойчивости к низкотемпературному стрессу являются гены ICE–CBF–COR каскада и гены яровизации *VRN*.

На сегодняшний день у пшеницы выявлены QTL-локусы оказывающие влияние на толерантность к низкотемпературному стрессу — FR-A2, Fr-B2 и FR1 (VRN1), расположенные на хромосомах 5-ой гомеологичной

группы и включающие ряд идентифицированных *CBF* и *VRN* генов, с полиморфизмом которых связаны фенотипические вариации по признаку LT-устойчивости. К идентифицированным генам этих локусов разработан ряд молекулярных маркеров.

Таким образом, в настоящее время генетика толерантности к низкотемпературному стрессу у пшеницы изучена недостаточно. На данный момент у этой культуры охарактеризовано всего около 60 генов. Полученных экспериментальных данных зачастую недостаточно для достоверного установления корреляций тех или иных полиморфизмов генов с признаком морозостойкости. По всей видимости, это связано с достаточно сложной организацией генома пшеницы, состоящего из нескольких субгеномов, а также участием в регуляции большого количества генов, образующих целые генные сети со смешанной природой регуляции, прямо или косвенно задействованные в контроле данного признака. В связи с этим углубленное изучение генетики LT-устойчивости, идентификация новых генов и разработка надежных молекулярных маркеров, ассоциированных с данным признаком, является актуальной задачей для селекции пшеницы в зоне умеренно-континентального климата.

Список используемых источников

1. What if the cold days return? Epigenetic mechanisms in plants to cold tolerance / R. Hereme [et al.] // *Planta* – 2021. – Vol. 254, № 3. – P. 46–57.
2. An efficient approach for the development of locus specific primers in bread wheat (*Triticum aestivum* L.) and its application to resequencing of genes involved in frost tolerance / S. Babben [et al.] // *PLoS ONE*. – 2015. – Vol. 10, № 11. – P. 1 371–1 393.
3. Колупаев, Ю. Е. Механизмы адаптации растений к гипотермии: роль антиоксидантной системы / Ю. Е. Колупаев, Е. И. Горелова, Т. О. Ястреб // *Вісник Харківського національного аграрного університету. Серія: Біологія*. – 2018. – вип. 1(43). – С. 6–33.
4. Association genetics studies on frost tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.) reveal new highly conserved amino acid substitutions in *CBF-A3*, *CBF-A15*, *VRN3* and *PPD1* genes / S. Babben [et al.] // *BMC Genomics*. – 2018. – Vol. 19. – P. 409–433.
5. Integrated transcriptomics and metabolomics

- analyses provide insights into cold stress response in wheat / Y. Zhao [et al.] // *The Crop Journal*. – 2019. – Vol. 7, № 6. – P. 857–866.
6. Physiological and transcriptomic analyses reveal a response mechanism to cold stress in *Santalum album* L. leaves / X. Zhang [et al.] // *Sci. Rep.* – 2017. – Vol. 7. – P. 42 165–42 183.
7. Tuteja, N. Absciscic acid and abiotic stress signaling / N. Tuteja // *Plant Signal Behav.* – 2007. – Vol. 2, № 3. – P. 135–138.
8. Genome-wide gene expression analysis supports a developmental model of low temperature tolerance gene regulation in wheat (*Triticum aestivum* L.) / D. Laudencia-Chingcuanco [et al.] // *BMC Genomics*. – 2011. – Vol. 12. – P. 299–318.
9. Quantitative trait loci associated with phenological development, low-temperature tolerance, grain quality, and agronomic characters in wheat (*Triticum aestivum* L.) / D. B. Fowler [et al.] // *PLoS One*. – 2016. – Vol. 11, № 3. – P. 1 371–1 392.
10. Genomic regions associated with tolerance to freezing stress and snow mold in winter wheat / E. B. Kruse [et al.] // *G3 (Bethesda)*. – 2017. – Vol. 7, № 3. – P. 775–780.
11. Skinner, D. Z. Genes upregulated in winter wheat (*Triticum aestivum* L.) during Mild Freezing and subsequent thawing suggest sequential activation of multiple response mechanisms / D. Z. Skinner // *PLoS One*. – 2015. – Vol. 10, № 7. – P. 1 371–1 388.
12. Regulation of the *Arabidopsis* CBF regulon by a complex low-temperature regulatory network / S. Park [et al.] // *Plant J.* – 2015. – Vol. 82, № 2. – P. 193–207.
13. Identification of mild freezing shock response pathways in barley based on transcriptome profiling / X. Wang [et al.] // *Front Plant Sci.* – 2016. – Vol. 7. – Art. 106, 13 p.
14. Mahajan, S. Cold, salinity and drought stresses: an overview / S. Mahajan, N. Tuteja // *Arch. Biochem. Biophys.* – 2005. – Vol. 444, № 2. – P. 139–158.
15. Chinnusamy, V. Cold stress regulation of gene expression in plants / V. Chinnusamy, J. Zhu, J.K. Zhu // *Trends Plant Sci.* – 2007. – Vol. 12. – P. 444–451.
16. 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.
17. Los, D. A. Regulatory role of membrane fluidity in gene expression and physiological functions / D. A. Los, K. S. Mironov, S. I. Allakhverdiev // *Photosynth. Res.* – 2013. – Vol. 116. – P. 489–509.
18. Guo, X. Cold signaling in plants: Insights into mechanisms and regulation / X. Guo, D. Liu, K. Chong // *J. Integr. Plant Biol.* – 2018. – Vol. 60, № 9. – P. 745–756.
19. Марковская, Е. Ф. Низкотемпературные сенсоры у растений: гипотезы и предположения / Е. Ф. Марковская, Т. Г. Шибаева // *Изв. Российск. АН. Сер. Биологическая*. – 2017. – № 2. – С. 120–128.
20. Shi, Y. Cold signal transduction and its interplay with phytohormones during cold acclimation / Y. Shi, Y. Ding, S. Yang // *Plant Cell Physiol.* – 2015. – Vol. 56, № 1. – P. 7–17.
21. Gene regulation and signal transduction in the ICE-CBF-COR signaling pathway during cold stress in plants / D. Z. Wang [et al.] // *Biochemistry*. – 2017. – Vol. 82, № 10. – P. 1 103–1 117.
22. Identification of genes from the ICE-CBF-COR pathway under cold stress in *Aegilops-Triticum* composite group and the evolution analysis with those from *Triticeae* / Y. Jin [et al.] // *Physiol. Mol. Biol. Plants*. – 2018. – Vol. 24, № 2. – P. 211–229.
23. SIZ1-mediated sumoylation of ICE1 controls CBF3 / DREB1A expression and freezing tolerance in *Arabidopsis* / K. Miura [et al.] // *Plant Cell*. – 2007. – Vol. 19, № 4. – P. 1 403–1 414.
24. ICE1: a regulator of cold-induced transcriptome and freezing tolerance in *Arabidopsis* / V. Chinnusamy [et al.] // *Genes Dev.* – 2003. – Vol. 17, № 8. – P. 1 043–1 054.
25. SCREAM / ICE1 and SCREAM2 specify three cell-state transitional steps leading to *Arabidopsis* stomatal differentiation / M. M. Kanaoka [et al.] // *Plant Cell*. – 2008. – Vol. 20, № 7. – P. 1 775–1 785.
26. EGR2 phosphatase regulates OST1 kinase activity and freezing tolerance in *Arabidopsis* / Y. Ding [et al.] // *EMBO J.* – 2019. – Vol. 38, № 1. – 17 p.
27. Kurbidaeva, A. ICE genes in *Arabidopsis thaliana*: clinal variation in DNA polymorphism and sequence diversification / A. Kurbidaeva, M. Novokreshchenova, T. Ezhova // *Biologia plantarum*. – 2015. – Vol. 59, № 2. – P. 245–252.
28. BRASSINOSTEROID-INSENSITIVE 2 negatively regulates the stability of transcription factor ice1 in response to cold stress in *Arabidopsis* / K. Ye [et al.] // *Plant Cell*. – 2019. – Vol. 31, № 11. – P. 2 682–2 696.
29. Gene regulation and signal transduction in the ICE-CBF-COR signaling pathway during cold stress in plants / D. Z. Wang [et al.] // *Biochemistry*

Moscow. – 2017. – Vol. 82. – P. 1 103–1 117.

30. PUB25 and PUB26 promote plant freezing tolerance by degrading the cold signaling negative regulator MYB15 / X. Wang [et al.] // *Dev. Cell.* – 2019. – Vol. 51, № 2. – P. 222–235.

31. Jasmonate regulates the inducer of CBF expression-C-repeat binding factor / DRE binding factor1 cascade and freezing tolerance in *Arabidopsis* / Y. Hu [et al.] // *Plant Cell.* – 2013. – Vol. 25, № 8. – P. 2 907–2 924.

32. Barrero-Gil, J. Gene regulatory networks mediating cold acclimation: the CBF pathway / J. Barrero-Gil, J. Salinas // *Adv. Exp. Med. Biol.* – 2018. – Vol. 1081. – P. 3–22.

33. Characterization and expression profiling of the ICE-CBF-COR genes in wheat / J. Guo [et al.] // *PeerJ.* – 2019. – Vol. 7. – 19 p.

34. Shi, Y. Molecular regulation of CBF signaling in cold acclimation / Y. Shi, Y. Ding, S. Yang // *Trends Plant Sci.* – 2018. – Vol. 23, № 7. – P. 623–637.

35. Phosphorylation of the transcriptional repressor MYB15 by mitogen-activated protein kinase 6 is required for freezing tolerance in *Arabidopsis* / S. H. Kim [et al.] // *Nucleic Acids Res.* – 2017. – Vol. 45, № 11. – P. 6 613–6 627.

36. Roles of CAMTA transcription factors and salicylic acid in configuring the low-temperature transcriptome and freezing tolerance of *Arabidopsis* / Y. Kim [et al.] // *Plant J.* – 2013. – Vol. 75, № 3. – P. 364–376.

37. Cold acclimation by the CBF-COR pathway in a changing climate: Lessons from *Arabidopsis thaliana* / Y. Liu [et al.] // *Plant Cell Rep.* – 2019. – Vol. 38, № 5. – P. 511–519.

38. PIF3 is a negative regulator of the CBF pathway and freezing tolerance in *Arabidopsis* / B. Jiang [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2017. – Vol. 114, № 32. – P. 6 695–6 702.

39. Brassinosteroids participate in the control of basal and acquired freezing tolerance of plants / M. Eremina [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2016. – Vol. 113, № 40. – P. 5 982–5 991.

40. MPK3- and MPK6-mediated ICE1 phosphorylation negatively regulates ICE1 stability and freezing tolerance in *Arabidopsis* / H. Li [et al.] // *Dev. Cell.* – 2017. – Vol. 43, № 5. – P. 630–642.

41. Transcript profiling of an *Arabidopsis* PSEUDO RESPONSE REGULATOR arrhythmic triple mutant reveals a role for the circadian clock in cold stress response / N. Nakamichi [et al.] // *Plant Cell Physiol.* – 2009. – Vol. 50, № 3. – P. 447–462.

42. Crosstalk between cold response and flowering in *Arabidopsis* is mediated through the flowering-time gene SOC1 and its upstream negative regulator FLC / E. Seo [et al.] // *Plant Cell.* – 2009. – Vol. 21, № 10. – P. 3 185–3 197.

43. Fowler, S. *Arabidopsis* transcriptome profiling indicates that multiple regulatory pathways are activated during cold acclimation in addition to the CBF cold response pathway / S. Fowler, M. F. Thomashow // *Plant Cell.* – 2002. – Vol. 14, № 8. – P. 1 675–1 690.

44. Mutational evidence for the critical role of CBF transcription factors in cold acclimation in *Arabidopsis* / C. Zhao [et al.] // *Plant Physiol.* – 2016. – Vol. 171, № 4. – P. 2 744–2 759.

45. ICE-CBF-COR signaling cascade and its regulation in plants responding to cold stress / D. Hwarari [et al.] // *Int. J. Mol. Sci.* – 2022. – Vol. 23, № 3. – P. 1 549–1 569.

46. COR / LEA proteins as indicators of frost tolerance in *Triticeae*: a comparison of controlled versus field conditions / K. Kosova [et al.] // *Plants.* – 2021. – Vol. 10, № 4. – 789 p.

47. Fine mapping and epistatic interactions of the vernalization gene VRN-D4 in hexaploid wheat / N. Kippes [et al.] // *Mol. Genet. Genomics.* – 2014. – Vol. 289, № 1. – P. 47–62.

48. Epigenetic regulation in plant abiotic stress responses / Y. N. Chang [et al.] // *J. Integr. Plant Biol.* – 2020. – Vol. 62, № 5. – P. 563–580.

49. Exploration of epigenetics for improvement of drought and other stress resistance in crops: A Review / C. Sun [et al.] // *Plants.* – 2021. – Vol. 10, № 6. – P. 1 226–1 242.

50. DNA methylation and plant stress responses / J. Deng [et al.] // *J. Plant Physiol. Pathol.* – 2018. – Vol. 6, № 4. – 6 910 p.

51. Variation in ICE1 methylation primarily determines phenotypic variation in freezing tolerance in *Arabidopsis thaliana* / H. Xie [et al.] // *Plant Cell Physiol.* – 2019. – Vol. 60, № 1. – P. 152–165.

52. MaMYB4 recruits histone deacetylase MaHDA2 and modulates the expression of ω -3 fatty acid desaturase genes during cold stress response in banana fruit / C. Song [et al.] // *Plant Cell Physiol.* – 2019. – Vol. 60, № 11. – P. 2 410–2 422.

53. Identification of small RNAs during cold acclimation in *Arabidopsis thaliana* / B. Tiwari [et al.] // *BMC Plant Biol.* – 2020. – Vol. 20, № 1. – P. 298–323.

54. Leuendorf, J. E. Acclimation, priming and memory in the response of *Arabidopsis thaliana*

- seedlings to cold stress / J. E. Leuendorf, M. Frank, T. Schmulling // *Sci. Rep.* – 2020. – Vol. 10, № 1. – P. 689–700.
55. Molecular signatures associated with increased freezing tolerance due to low temperature memory in *Arabidopsis* / E. Zuther [et al.] // *Plant Cell Environ.* – 2019. – Vol. 42, № 3. P. 854–873.
56. Chromatin-based mechanisms of temperature memory in plants / T. Friedrich [et al.] // *Plant Cell Environ.* – 2019. – Vol. 42, № 3. – P. 762–770.
57. The expression of several *CBF* genes at the Fr-A2 locus is linked to frost resistance in wheat / A. Vagujfalvi [et al.] // *Mol. Genet. Genomics.* – 2005. – Vol. 274, № 5. – P. 506–514.
58. Identification of quantitative trait loci and associated candidate genes for low-temperature tolerance in cold-hardy winter wheat / M. Båga [et al.] // *Funct. Integr. Genomics.* – 2007. – Vol. 7, № 1. – P. 53–68.
59. Freezing tolerance-associated quantitative trait loci in the brundage × coda wheat recombinant inbred line population / A. Case [et al.] // *Crop Science.* – 2014. – Vol. 54, № 3. – P. 982–992.
60. Copy number variation of *CBF-A14* at the Fr-A2 locus determines frost tolerance in winter durum wheat / A. N. Sieber [et al.] // *Theor. Appl. Genet.* – 2016. – Vol. 129, № 6. – P. 1 087–1 097.
61. Copy number variations of *CBF* genes at the Fr-A2 locus are essential components of winter hardiness in wheat / T. Würschum [et al.] // *Plant J.* – 2017. – Vol. 89, № 4. – P. 764–773.
62. Genome-wide association study reveals the genetic basis of cold tolerance in wheat / Y. Zhao [et al.] // *Molecular Breeding.* – 2020. – Vol. 40, № 4. – P. 36–41.
63. Dissecting the genetic architecture of frost tolerance in Central European winter wheat / Y. Zhao [et al.] // *J. Exp. Bot.* – 2013. – Vol. 64, № 14. – P. 4 453–4 460.
64. Copy number and haplotype variation at the VRN-A1 and central FR-A2 loci are associated with frost tolerance in hexaploid wheat / J. Zhu [et al.] // *Theor. Appl. Genet.* – 2014. – Vol. 127, № 5. – P. 1183–1 197.
65. Allelic variation at the VRN-1 promoter region in polyploid wheat / L. Yan [et al.] // *Theor. Appl. Genet.* – 2004. – Vol. 109, № 8. – P. 1 677–1686.
66. A novel retrotransposon inserted in the dominant VRN-B1 allele confers spring growth habit in tetraploid wheat (*Triticum turgidum* L.) / C. G. Chu [et al.] // *G3 (Bethesda).* – 2011. – Vol. 1, № 7. – P. 637–645.
67. Large deletions within the first intron in VRN-1 are associated with spring growth habit in barley and wheat / D. Fu [et al.] // *Mol. Genet. Genomics.* – 2005. – Vol. 273, № 1. – P. 54–65.
68. Eagles, H. A. Veery wheats carry an allele of Vrn-A1 that has implications for freezing tolerance in winter wheats / H. A. Eagles, K. Cane, B. Trevaskis // *Plant Breeding.* – 2011. – Vol. 130, № 4. – P. 413–418.
69. Genetic and Molecular Characterization of Vernalization Genes Vrn-A1, Vrn-B1, and Vrn-D1 in Spring Wheat Germplasm from the Pacific Northwest Region of the USA / D. Santra [et al.] // *Plant Breeding.* – 2009. – Vol. 128, № 6. – P. 576–584.
70. Identification of candidate *CBF* genes for the frost tolerance locus Fr-Am2 in *Triticum monococcum* / A. K. Knox [et al.] // *Plant Mol. Biol.* – 2008. – Vol. 67, № 3. – P. 257–270.
71. Large deletions in the *CBF* gene cluster at the Fr-B2 locus are associated with reduced frost tolerance in wheat / S. Pearce [et al.] // *Theor. Appl. Genet.* – 2013. – Vol. 126, № 11. – P. 2 683–2 697.
72. Regulatory genes involved in the determination of frost tolerance in temperate cereals / G. Galiba [et al.] // *Plant Science.* – 2009. – Vol. 176, № 1. – P. 12–19.
73. A pseudo-response regulator is misexpressed in the photoperiod insensitive Ppd-D1a mutant of wheat (*Triticum aestivum* L.) / J. Beales [et al.] // *Theor. Appl. Genet.* – 2007. – Vol. 115, № 5. – P. 721–733.

O. M. Lyusikov¹, I. S. Gordej¹, V. E. Shymko¹, O. S. Matievskaja¹, S. I. Gordej², I. V. Satsuk²

MOLECULAR-GENETIC ASPECTS OF WINTER WHEAT (*TRÍTICUM* L.) RESISTANCE TO LOW TEMPERATURE STRESS

¹State Scientific Institution

"Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus"

27 Akademicheskaya St., 220072 Minsk, Republic of Belarus

e-mail: O.Lyusikov@igc.by

²Republican and Unitary Enterprise

"Scientific and Practical Centre of the National Academy of Sciences of Belarus for Arable Farming"

1 Timiryazeva St., 222160 Zhodino, Republic of Belarus

The review article presents modern submissions about the molecular-genetic foundations of the winter wheat (*Triticum* L.) resistance to low temperature stress. The main signaling pathways and identified resistance genes are described. The relevance of the development of specific molecular markers associated with resistance to low temperature stress for use in breeding is shown.

Keywords: wheat, low temperature stress, frost resistance, cold resistance, winter hardiness, ICE-CBF-COR pathway, transcription factors, molecular markers.

Дата поступления статьи: 05 сентября 2022 г.

ИНСТРУКЦИЯ ДЛЯ АВТОРОВ ПО ОФОРМЛЕНИЮ СТАТЕЙ

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

Статьи публикуются на русском, белорусском и английском языках.

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

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

ДЛЯ ОПУБЛИКОВАНИЯ РАССМАТРИВАЮТСЯ СЛЕДУЮЩИЕ ТИПЫ СТАТЕЙ

Экспериментальная статья

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

Обзорная статья

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

Краткое сообщение

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

СТРУКТУРА СТАТЬИ

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

1. УДК

Располагается в верхнем левом углу страницы.

2. Инициалы и фамилии авторов

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

3. Название статьи

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

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

4. Место работы авторов с почтовым адресом

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

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

5. Авторское резюме (аннотация)

Располагается после места работы авторов, набирается прямым начертанием.

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

6. Ключевые слова (5–10 слов)

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

7. Основной текст статьи

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

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

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

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

Вставка в текст символов (например, 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 ($q_{\text{ср}}$);
- 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 33

Ответственный за выпуск *Е. М. Селихова*
Переводчик *М. Г. Пыжова*

Подписано в печать 12.11.2022 г. Формат 60×84^{1/8}. Бумага офсетная. Гарнитура Times.
Печать цифровая. Усл. печ. л. 18,02. Уч.-изд. л. 14,07. Тираж 100 экз. Заказ № 2663.

Отпечатано в УП «Интегралполиграф»
Свидетельство о государственной регистрации издателя, изготовителя
и распространителя печатных изданий № 2/15 от 21.11.2013
ул. Корженевского, д. 16, к. 101, 220108, г. Минск

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.