

ISSN 1999-9127

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

МОЛЕКУЛЯРНАЯ И ПРИКЛАДНАЯ ГЕНЕТИКА

**СБОРНИК НАУЧНЫХ ТРУДОВ
ТОМ 31**

Издается с 2005 года
Выходит два раза в год

Минск
2021

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. — 164 с. — ISSN 1999-9127.

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

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

Редакционная коллегия:

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

СОДЕРЖАНИЕ

<i>Е. Л. Романишко, М. Е. Михайлова, А. И. Киреева, Р. И. Шейко</i> Выявление гаплотипов фертильности в белорусской популяции крупного рогатого скота голштинской породы	7
<i>О. Г. Бабак, Е. В. Дрозд, Н. А. Некрашевич, Н. В. Анисимова, К. К. Яцевич, И. Е. Баева, И. Г. Пугачева, А. В. Французенок, М. М. Добродькин, А. В. Кильчевский</i> Оценка и применение молекулярных маркеров в селекции на устойчивость томата (<i>Solanum lycopersicum</i> L.) к фитофторе (<i>Phytophthora infestans</i>)	22
<i>С. В. Суховеева, Е. М. Кабачевская, И. Д. Волотовский</i> О сопряжении экспрессии некоторых генов фосфолипидного, углеводного метаболизма и трансмембранного транспорта растений томата с их реакцией гравитропизма	31
<i>О. А. Орловская, С. И. Вакула, Л. В. Хотылёва, А. В. Кильчевский</i> Корреляции и структура вариации признаков качества зерна и продуктивности линий пшеницы с чужеродным генетическим материалом	42
<i>К. Ю. Песоцкая, А. Л. Лагоненко, А. Н. Евтушенко</i> Изучение роли транскрипционного регулятора MarR в вирулентности фитопатогенных бактерий <i>Erwinia amylovora</i>	53
<i>В. А. Лемеш, В. Н. Купень, М. В. Богданова, А. А. Буракова, О. И. Добыш, Н. И. Рябоконт, Н. В. Никитченко, А. Н. Островская</i> Определение возраста человека, основанное на анализе статуса метилирования CpG-сайтов в ДНК спермы	62
<i>Е. В. Кобец, Э. В. Руденко, Е. В. Руденко, О. Ю. Самоховец, Т. Г. Капустина, П. М. Морозик</i> Анализ ассоциации полиморфных вариантов генов <i>VDR</i> и <i>MTHFR</i> со статусом витамина D у белорусских женщин	72
<i>А. В. Колубако, Е. А. Николайчик</i> Транскрипционный фактор WRKY65 участвует в регуляции иммунного ответа растений картофеля на <i>Pectobacterium versatile</i>	83
<i>А. И. Левданская, А. С. Светлова, Н. П. Максимова, Е. Г. Веремеенко</i> Экспрессия феназинового оперона у штаммов <i>Pseudomonas chlororaphis</i> subsp. <i>aurantiaca</i> В-162, способных к сверхсинтезу феназиновых соединений	93
<i>Е. В. Лагуновская</i> Идентификация микросателлитных локусов, ассоциированных с эмбриогенным потенциалом у генотипов пшеницы в культуре пыльников <i>in vitro</i>	102
<i>О. Д. Левданский, Р. С. Шулинский, Е. А. Мишук, Л. Н. Сивицкая</i> Сравнение методов фазирования генотипов для данных высокопроизводительного секвенирования последовательностей клинических экзомов	114

<i>А. Н. Заинчковская, Е. П. Хмилевская, А. М. Шишлова-Соколовская, С. В. Косьяненко, Е. А. Фомина, О. Ю. Урбанович</i> Генетическое разнообразие линий кур белорусской селекции по аллельному составу генов <i>PRL</i> , <i>GH</i> и <i>IGF-I</i> , ассоциированных с продуктивностью	124
<i>А. Н. Верчук, С. В. Кубрак, А. В. Кильчевский</i> Направления современной палинологии и перспективы использования баркодирования ДНК для дифференциации растений по пыльце	134
<i>Н. И. Дубовец, Н. М. Казнина, О. А. Орловская, Е. А. Сычёва</i> Проблема дефицита цинка в рационе питания населения и биотехнологические подходы к ее решению	147

CONTENTS

<i>E. L. Ramanishka, A. I. Kireyeva, M. E. Mikhailova, R. I. Sheyko</i> Identification of fertility haplotypes in the belarusian population of holstein cattle.....	7
<i>O. G. Babak, E. V. Drozd, N. A. Nekrashevich, N. V. Anisimova, K. K. Yatsevich, I. E. Bayeva, A. V. Frantsuzionak, I. G. Pugachova, M. M. Dobrodkin, A. V. Kilchevsky</i> Assessment and application of molecular markers in breeding for the resistance of tomato (<i>Solanum lycopersicum</i> L.) to late blight (<i>Phytophthora infestans</i>).....	22
<i>S. V. Sukhaveyeva, A. M. Kabachevskaya, I. D. Volotovskii</i> On the coupling of expression of some key genes controlling phospholipid, carbohydrate metabolism and transmembrane transport in tomato plants with their gravitropic reaction	31
<i>O. A. Orlovskaya, S. I. Vakula, L. V. Khotyleva, A. V. Kilchevsky</i> Correlations and variation structure of grain quality traits and yield of wheat lines with foreign genetic material	42
<i>K. Yu. Pesotskaya, A. L. Lagonenko, A. N. Evtushenkov</i> Discovering the role of the transcriptional regulator MarR in the virulence of phytopathogenic bacteria <i>Erwinia amylovora</i>	53
<i>V. A. Lemesh, V. N. Kipen, M. V. Bahdanava, A. A. Burakova, O. I. Dobysh, N. I. Ryabokon, N. V. Nikitchenko, A. N. Ostrovskaya</i> Determination of human age based on the analysis of the status of CpG sites methylation in sperm DNA.....	62
<i>E. V. Kobets, E. V. Rudenko, A. V. Rudenko, V. Yu. Samokhovec, T. G. Kapustsina, P. M. Marozik</i> Analysis of an association of polymorphic <i>VDR</i> and <i>MTHFR</i> gene variants with vitamin D status in belarusian women	72
<i>N. V. Kalubaka, Y. A. Nikolaichik</i> Transcription factor WRKY65 participates in the regulation of a potato plant immune response to <i>Pectobacterium versatile</i>	83
<i>A. I. Liaudanskaya, A. S. Svetlova, N. P. Maximova, K. G. Verameyenko</i> Expression of the phenazine operon in <i>Pseudomonas chlororaphis</i> subsp. <i>aurantiaca</i> B-162 strains capable of overproduction of phenazine compounds.....	93
<i>E. V. Lagunovskaya</i> Identification of microsatellite loci associated with embryogenic potential in wheat genotypes in anther culture <i>in vitro</i>	102
<i>A. D. Liaudanski, R. S. Shulinski, Y. A. Mishuk, L. N. Sivitskaya</i> Comparison of genotype phasing methods for the high throughput sequencing data of clinical exomes	114
<i>A. N. Zainchkovskaya, E. P. Khmylevskaya, A. M. Shishlova-Sokolovskaya, S. V. Kosyanenko, A. A. Famina, O. Yu. Urbanovich</i> Genetic diversity of the chicken lines of belarusian breeding by allelic composition of <i>PRL</i> , <i>GH</i> and <i>IGF-I</i> genes associated with productivity	124

A. N. Viarchuk, S. V. Kubrak, A. V. Kilchevskiy
Trends in modern palynology and prospects of using DNA barcoding for the differentiation of plants by pollen..... 134

N. I. Dubovets, N. M. Kaznina, O. A. Orlovskaya, E. A. Sycheva
Problem of zinc deficiency in a diet of the population and biotechnological approaches to its solution 147

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

ВЫЯВЛЕНИЕ ГАПЛОТИПОВ ФЕРТИЛЬНОСТИ В БЕЛОРУССКОЙ ПОПУЛЯЦИИ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА ГОЛШТИНСКОЙ ПОРОДЫ

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

Длительный искусственный отбор высокопродуктивных племенных животных скрытых носителей генетических аномалий привел к накоплению груза рецессивных мутаций в популяции крупного рогатого скота. Начиная с 2007 года в лаборатории генетики животных проводится исследование КРС голштинской породы по гаплотипам фертильности ННС, ННВ и ННД, а с 2016 года добавили исследования по гаплотипам НН0, НН1, НН3, НН4, НН5, НСД, оказывающим влияние на воспроизводительные качества и ассоциированные с эмбриональной и ранней постэмбриональной смертностью телят. С помощью разработанных нами методов выявлены мутации в генах *FANCI*, *APAF1*, *SMC2*, *GART*, *TFB1M*, *SLC35A3*, *ITGB2*, *APOB* и *UMPS*, ассоциированные с данными гаплотипами. Мониторинг популяций КРС в Беларуси (n = 4 101 гол.) выявил частоту встречаемости животных скрытых носителей мутантных аллелей гаплотипа НН0, составившие 3,42%, НН1 — 2,82%, НН3 — 3,75%, НН4 — 0,59%, НСД — 2,35%, НН5 — 2,2%, ННС — 2,56%, ННВ — 0,65%, ННД — 0%. Считаем, что дальнейшее проведение ДНК-диагностики племенного скота зарубежной и отечественной селекции позволит снизить распространение генетических дефектов, снижающих репродуктивные качества скота.

Ключевые слова: КРС, генетические дефекты, ДНК-тестирование, гаплотипы фертильности, *APAF1*, *SMC2*, *GART*, *TFB1M*, *APOB*, *FANCI*, *SLC35A3*, *ITGB2*, *UMPS*.

Введение

В Республике Беларусь основная доля молочного скота приходится на поголовье голштинизированной черно-пестрой породы. В связи с интенсивной селекцией, направленной на увеличение молочной продуктивности и применение искусственного осеменения спермой быков зарубежной селекции, у коров выявляются проблемы, связанные со снижением их репродуктивной способности [1–3]. Причиной являются LoF-мутации, которые в гомозиготном состоянии проявляют летальный эффект и приводят к гибели эмбрионов. В настоящее время в голштинской породе выявлены 12 гаплотипов фертильности (НСД, НН0, НН1, НН2, НН3, НН4, НН5, НН6, НН7, ННВ, ННС, ННД), оказывающие влияние на осеменение и ассоциированные с эмбриональной и ранней постэмбриональной смертностью на различных стадиях развития [4].

Гаплотип фертильности НН0, ранее известный как брахиспинальный синдром крупного

рогатого скота, это заболевание опорно-двигательного аппарата, которое характеризуется как выраженным снижением массы тела, задержкой роста, тяжелым пороком развития сердца, почек и яичек, так и снижением плодовитости животных и увеличением сервис-периода коров. Причиной данного генетического дефекта является делеция 3 329 п. н. в гене *FANCI*. Первоначально данное заболевание обнаружено у быка Sweet Haven Tradition (США) [5–9].

Гаплотип фертильности НН1 приводит к спонтанной эмбриональной смертности на разных сроках стельности у гомозиготных животных по мутантному аллелю. Причиной мутацией НН1 является однонуклеотидный полиморфизм С→Т в гене *APAF1* (rs448942533), который обуславливает аминокислотную замену Gln579Stop-кодон. Это приводит к укорочению белка APAF1, который необходим для нормального эмбрионального развития. Впервые мутация обнаружена у быка Pawnee Farm Arlinda Chief и его сына Walkway Chief mark

(США) [10–12].

Гаплотип фертильности ННЗ приводит к потере стельности коров. Однонуклеотидный полиморфизм Т→С в гене *SMC2* (rs456206907) приводит к аминокислотной замене Phe1135Ser. Белок *SMC2* играет важную роль в процессах репарации ДНК, конденсации хромосом и их сегрегации в процессе клеточного деления. Впервые гаплотип ННЗ выявлен у быков Glendell Arlinda Chief и Gay View Skyliner (США) [10, 13–15].

Гаплотип фертильности НН4 вызывает эмбриональную смертность. Однонуклеотидный полиморфизм А→С в гене *GART* (rs465495560) обуславливает аминокислотную замену Asn290Thr, вследствие чего нарушается синтез белка *GART*, который участвует в биосинтезе пуринов и необходим для нормального эмбрионального развития. Широкое распространение гаплотипа НН4 произошло от французского быка Jocko Besne [4, 16].

Гаплотип фертильности НН5 обуславливает эмбриональную смертность в срок до 2 месяцев стельности. Причиной эмбриональной смертности является делеция размером 138 т. п. н. в гене *TFB1M*, который инициирует трансляцию белков в митохондриях. Нарушение биосинтеза у гомозиготных животных вызывает абортруемость эмбрионов. Распространение гаплотипа НН4 произошло от канадского быка Thornlea Texal [17].

Гаплотип фертильности НСD (дефицит холестерина) характеризуется нарушением метаболизма холестерина, что приводит к потере аппетита и веса, физической слабости, диарее (не поддающейся медикаментозному лечению) и вызывает гибель телят в первые недели или месяцы жизни. У гетерозиготных животных наблюдается пониженное содержание холестерина в крови, в то время как у гомозиготных животных холестерин вообще отсутствует. Генетической причиной возникновения гаплотипа НСD является вставка 1 299 п. н. в гене *APOB*. Эта инсерция обуславливает сдвиг рамки считывания и приводит к отсечению 97% соответствующего белка длиной 4 567 аминокислот (Gly135ValfsX10). Такой дефектный белок блокирует выделение хиломикрона из клеток кишечника и ведет к абсорбции холестерина. Распространение в популяции голштинского скота НСD произошло от канадского быка

Mauglin Storm [17–19].

Комплексный порок позвоночника (СVM или гаплотип ННС) — моногенное летальное аутосомно-рецессивное заболевание, приводящее к аномальному развитию позвоночного столба, контрактуре конечностей, деформации костей, патологии сердечно-сосудистой системы и др. Однако, помимо дефектов развития, это заболевание вызывает аборт или рождение недоношенных, мертворожденных телят, поэтому также относится к гаплотипам фертильности — ННС. Причинной мутацией гаплотипа является однонуклеотидная замена гуанина на тимин (G→T) в гене *SLC35A3* (rs438228855), кодирующий синтез транспортера UDP-N-ацетилглюкозамина, локализованного в мембране аппарата Гольджи. В результате мутации происходит замена валина на фенилаланин (p.Val180Phe) в белке-переносчике уридиндифосфат-N-ацетилглюкозамина (UDP-GlcNAc), который регулирует транспорт нуклеотидсвязанных сахаров, и участвует в гликозилировании белков, играющих важную роль в формировании позвоночника и ребер. Распространителем этого генетического дефекта является бык класса элита Carlin-M Ivanhoe Bell (7H543) [20–22].

Дефицит адгезии лейкоцитов (BLAD или ННВ) — моногенное летальное аутосомно-рецессивное заболевание, приводящее к нарушению иммунного ответа организма на инфекционные агенты. У больных животных происходит нарушение адгезии и диапедеза. Заболевание возникает в следствии замены А→G (rs445709131) в гене *ITGB2*, кодирующем синтез мембранного гликопротеина — лейкоцитарного β2-интегрин, что приводит к замене аспарагиновой кислоты на глицин (p.Asp128Gly). Больные гомозиготные животные погибают, так как не способны противостоять бактериальным инфекциям из-за слабого иммунитета и нарушения способности нейтрофилов проникать из кровотока к очагам инфекции. У животных развивается пневмония, стоматит, энтерит, периодонтит и др., что приводит к гибели телят в первый год жизни. Данное заболевание также относится к гаплотипу фертильности ННВ и впервые обнаружено у быка Carlin-M Ivanhoe Bell [22–24].

Дефицит уридинмонофосфатсинтетазы (DUMPS или ННD) — наследственное леталь-

ное аутосомно-рецессивное заболевание, причиной которого является однонуклеотидная замена С→Т в гене *UMPS*. В результате мутации цитозин в кодоне 405 (CGA — аргинин) заменяется на тимин (TGA stop-кодон), что приводит к дефициту фермента уридинмонофосфатсинтазы, который является ключевым элементом при *de novo* синтезе пиримидиновых нуклеотидных оснований. Нарушение синтеза фермента приводит к ранней эмбриональной смертности на стадии имплантации эмбриона в матку. Распространение DUMPS произошло от быка Skokie Sensation Ned 1308101 и его потомков [25].

Генетические дефекты BLAD, DUMPS и SVM в популяции голштинского скота исследуются с 1992, 1993 и 2006 годов соответственно. В настоящее время мутации, приводящие к снижению фертильности и повлекшие эмбриональную и раннюю постэмбриональную смертность, получили название «гаплотипы фертильности». Поэтому ранее известный генетический дефект как комплексный порок позвоночника (SVM) обозначают как гаплотип фертильности ННС, дефицит адгезии лейкоцитов (BLAD) — ННВ, а дефицит уридинмонофосфатсинтазы (DUMPS) — ННД.

Наличие в популяции голштинского скота гаплотипов фертильности, приводящих к пренатальной и постнатальной смертности телят, влечет за собой значительные экономические потери и приводит к накоплению в поголовье скота генетического груза мутаций. Современные молекулярные методы позволяют проводить ДНК диагностику племенных животных и выявлять животных скрытых носителей генетических дефектов, исключая тем самым их из селекционного процесса. Поэтому целью нашего исследования явилась разработка методов детекции полиморфизмов в генах ассоциированных с гаплотипами фертильности, а также проведение анализа генетической структуры белорусской популяции голштинского племенного скота и определение частоты мутантных аллелей, вызывающих генетически детерминированные наследственные заболевания.

Материалы и методы

В качестве объекта исследования был использован крупный рогатый скот голштинской породы ($n = 4\ 101$ 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). Количество 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 идентификации 9 гаплотипов фертильности крупного рогатого скота были использованы следующие методы: ПЦР, ПЦР-ПДРФ, АС-ПЦР-РВ, ПЦР-РВ и секвенирование по Сэнгеру для валидации методов (табл. 1).

ПЦР (полимеразная цепная реакция)

Полимеразную цепную реакцию проводили на приборе С-1000 (Bio-Rad, США). Для получения специфичных ПЦР-продуктов в исследуемом локусе гена *FANCI* (гаплотип НН0), использовали следующие праймеры: 5'-GCTCAAGTAGTTAGTTGCTCCACTG-3' и 5'-ATAAATAAATAAAGCAGGATGCTGAAA-3' [26]. ПЦР в объеме 20 мкл реакционной смеси, содержала: 5 × ПЦР буфер (+MgCl₂), по 0,3 мкМ каждого праймера, 0,2 мМ dNTP, 1U ДНК-полимеразы, деионизированную MQ-H₂O и 10 нг геномной ДНК. Полимеразную цепную реакцию проводили по программе: 98 °С — 30 с; 98 °С — 5 с; 66 °С — 20 с; 72 °С — 1 мин (35 циклов).

Для получения ПЦР-продуктов гена *TFB1M* (гаплотип НН5) использовали следующие праймеры: 5'-AGATATGCTAAAGTTTACCTAGAAGAA-3', 5'-CTGAAGCTCCATTCTGAGTCAT-3', 5'-TGCTCTATGAATTTTGTGAATGGT-3' [17]. ПЦР в объеме 20 мкл реакционной смеси, содержала: 1 × ПЦР буфер (+MgCl₂), по 0,2–0,4 мкМ праймеров, 0,2 мМ dNTP, 1 ед. *Taq*-полимеразы, MQ-H₂O и 15 нг геномной ДНК. Программа амплификации: 95 °С — 3 мин; 95 °С — 30 с; 55 °С — 30 с; 72 °С — 1 мин (40 циклов).

Для получения специфичных ПЦР-продуктов гена *APOB* (гаплотип НСD) использовали следующие олигонуклеотидные праймеры: 5'-GGTGACCATCCTCTCTCTGTC-3', 5'-AGTGGAACCCAGCTCCATTA-3', 5'-CACCTCCGCTATTTCGAGAG-3' [18]. ПЦР в объеме 20 мкл реакционной смеси, содержала: 1 × ПЦР буфер (+MgCl₂), по 0,1–

Таблица 1

Описание летальных гаплотипов фертильности и методов их идентификации

Гаплотип	Ген	Хромосома	Локализация	Полиморфизм (SNP)	Тип мутации	Метод
НН0	<i>FANCI</i>	21	21184870–21188198	–	делеция 3329 п. н. (Val876Leufs26X)	ПЦР
НН1	<i>APAF1</i>	5	62810245	rs448942533	C > T (Gln579Ter)	ПЦР-ПДРФ
НН3	<i>SMC2</i>	8	93753358	rs456206907	T > C (Phe1135Ser)	АС-ПЦР-РВ
НН4	<i>GART</i>	1	1997582	rs465495560	A > C (Asn290Thr)	ПЦР-РВ
НН5	<i>TFB1M</i>	9	92,350,052–93,910,957	–	делеция 138 т. п. н.	ПЦР
НCD	<i>APOB</i>	11	77,953,380–78,040,118	–	вставка 1299 п. н. (Gly135ValfsX10)	ПЦР
ННС	<i>SLC35A3</i>	3	43261945	rs438228855	G > T (Val180Phe)	ПЦР-РВ
ННВ	<i>ITGB2</i>	1	144770078	rs445709131	A > G (Asp128Gly)	ПЦР-РВ
ННD	<i>UMPS</i>	1	69756880	–	C > T (Arg405X)	ПЦР-ПДРФ

0,3 мкМ праймеров, 0,2 мМ dNTP, 1 ед. *Taq*-полимеразы, MQ-H₂O и 15 нг геномной ДНК. Программа амплификации: 95 °С — 3 мин; 95 °С — 30 с; 58 °С — 30 с; 72 °С — 1 мин (35 циклов).

Определение аллельных вариантов генов *FANCI*, *TFB1M*, *APOB* осуществляли с помощью электрофореза в 1,7% агарозном геле (SeaKem LE Agarose, «Lonsa») с интеркали-

рующим красителем ZUBR Green-1 («Прайм-тех», Беларусь). Анализ результатов проводили относительно маркера молекулярных масс SM1113 и SM0623 100bp DNA Ladder («Thermo scientific», EU) и контрольных образцов. Анализ и учет полученных результатов ПЦР фрагментов генов *FANCI* (рис. 1), *TFB1M* (рис. 2), *APOB* (рис. 3) осуществляли с помощью системы гель-документирования

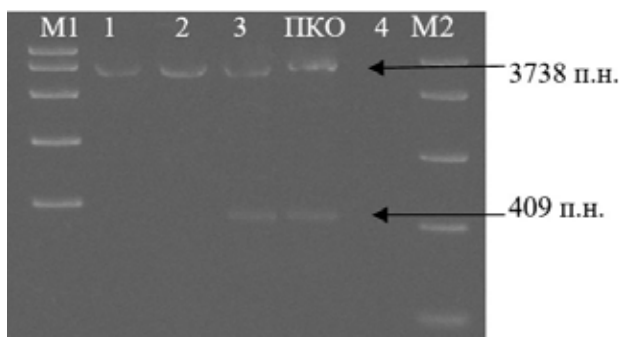


Рис.1. Электрофореграмма ПЦР-продуктов локуса гена *FANCI*: M1 — маркер молекулярной длины, DNA Ladder SM 1123; M2 — SM1113; 1 и 2 — здоровые животные (ВУФ или НН0Т), ПЦР-продукт 3738 п. н.; 3 — животное-носитель брахиспины (ВУС или НН0С), ПЦР-продукты 409 п. н. и 3738 п. н.; ПКО — положительный контрольный образец; 4 — контроль без матрицы (NTC)

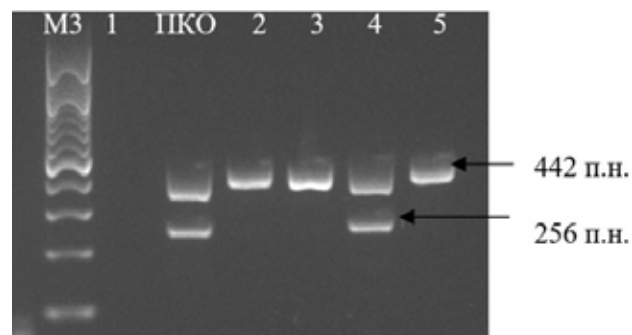


Рис.2. Электрофореграмма ПЦР-продуктов локуса гена *TFB1M*: M3 — маркер молекулярной длины, SM0623; ПКО — положительный контрольный образец; 1 — контроль без матрицы (NTC); 2, 3, 5 — здоровые животные (НН5Т), ПЦР-продукт 442 п. н.; 4 — животное-носитель нормального и мутантного аллеля (НН5С), ПЦР-продукты 442 п. н. и 256 п. н.

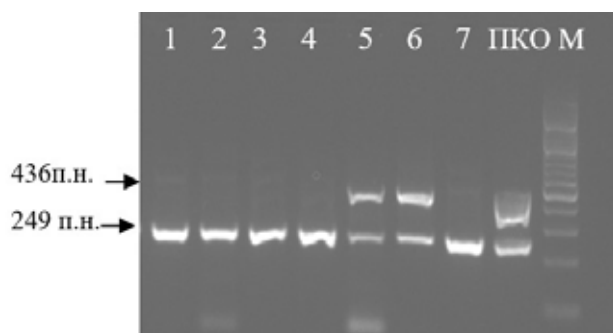


Рис.3. Электрофореграмма рестриционных фрагментов локуса гена *APOB*: М — маркер молекулярной длины, SM0623; 1 — контроль без матрицы (NTC); 2 — положительный контрольный образец (ПКО); 3, 4–7 — здоровые животные (HCD0), ПЦР-продукт 249 п. н.; 8 — животное-носитель нормального и мутантного аллелей (HCD1 или HCD3), ПЦР-продукты 249 п. н и 436 п. н)

Quantum ST4 («Vilber Lourman», Франция). Животные-носители мутаций помечаются символом С (carrier), а свободные от мутации особи символом F (free) или Т (Tested Non-Carrier).

ПЦР-ПДРФ (полимеразная цепная реакция – полиморфизм длин рестриционных фрагментов)

ПЦР проводили на приборе С1000 (BioRad, США). Дизайн праймеров для получения специфичных фрагментов гена *APAF1* (НН1) длиной 166 п. н. осуществлялся с помощью программы Primer 3. Анализ последовательности исследуемых генов проводили с помощью Ensembl в форматах FASTA. Реакционная смесь для ПЦР в 20 мкл реакционной смеси содержала: 10 × ПЦР буфер, 1 ед. *Taq*-полимеразы, 2 мМ MgCl₂, 0,2 мМ dNTPs, по 0,3 мкМ каждого праймера, MQ-H₂O и по 10 нг геномной ДНК для каждого образца. Программа амплификации: 94 °С — 5 мин; 94 °С — 30 с; 59 °С — 30 с; 72 °С — 40 с; 72 °С — 40 с; 72 °С — 1 мин (32 цикла). Для анализа рестриционных фрагментов использовали 1 ед. *Sac8I*.

Для получения специфичного ПЦР-продукта гена *UMPS* (ННД) длиной 241 п. н. использовали праймеры: 5'-ATTACCAATCAATAGCTTACCTCC-3', 5'-TGAGTTC AATGTGAATGAGAAAAT-3' [27]. ПЦР проводили в 25 мкл реакционной смеси, которая содержит: 2x DreamTaq мастер

микс, по 0,5 мкМ каждого праймера и 5 нг геномной ДНК. Программа амплификации: 94 °С — 3 мин; 95 °С — 30 с, 61 °С — 30 с; 72 °С — 40 с (35 циклов). Для анализа рестриционных фрагментов использовали 1 ед. *AvaI*.

Определение генотипов животных по генам *APAF1* и *UMPS* осуществляли с помощью электрофореза в 3% агарозном геле (SeaKem LE Agarose, «Lonsa») с интеркалирующим красителем ZUBR Green-1 («Праймтех», Беларусь). Анализ результатов проводили относительно маркера молекулярных масс SM1233 DNA Ladder («Thermo scientific», EU) и контрольных образцов. Анализ и учет полученных результатов ПЦР фрагментов генов

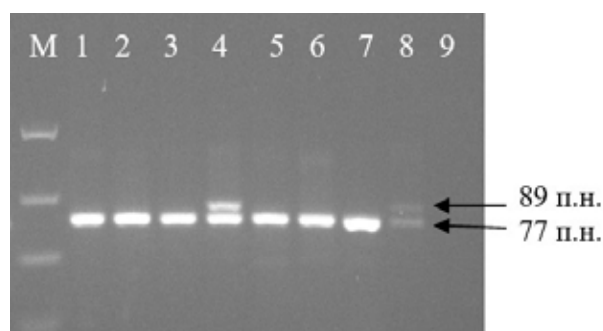


Рис.4. Электрофореграмма рестриционных фрагментов локуса гена *APAF1*: М — маркер молекулярной длины, DNA Ladder SM1223; 1–3, 5–7 — здоровые животные (ННТ), длина рестриционного фрагмента 77 п. н.; 4 — животное-носитель нормального и мутантного аллеля (ННС), ПЦР-продукты 89 п. н. и 77 п. н.; 8 — ПКО — положительный контрольный образец; 9 — контроль без матрицы (NTC)

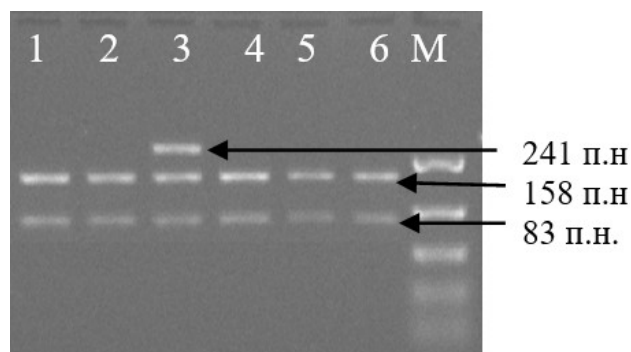


Рис.5. Электрофореграмма рестриционных фрагментов локуса гена *UMPS*: 1–2, 4–6 — здоровые животные (DPF или ННДТ) — 158 п. н. и 83 п. н.; 3 — животное-носитель мутантной аллели (DPC или ННДС) — 241 п. н., 158 п. н. и 83 п. н.; М — маркер SM1233

APAF1 (рис. 4) и *UMPS* (рис. 5), осуществляли с помощью системы гель-документирования Quantum ST4.

АС-ПЦР-РВ (аллель-специфическая полимеразная цепная реакция в реальном времени)

АС-ПЦР проводили на приборе CFX96 (Bio-Rad, США). Дизайн праймеров для получения специфичных фрагментов гена *SMC2* (НН3) осуществлялся с помощью программы Primer 3. Анализ последовательности исследуемых генов проводили с помощью Ensembl в форматах FASTA. Реакционная смесь для проведения ПЦР в 20 мкл содержала: 2x SYBR Green qPCR мастер микс, по 0,3 мкМ каждого праймера и 15 нг геномной ДНК. Программа амплификации: 95 °С — 10 мин; 95 °С — 10 с; 59 °С — 30 с; 62 °С — 30 с (40 циклов). Анализ и учет полученных результатов ПЦР осуществляли с использованием программного

обеспечения Bio-Rad CFX Maestro 3.1 (рис. 6).

ПЦР-РВ (полимеразная цепная реакция в реальном времени)

ПЦР-РВ проводили на приборе CFX96 (Bio-Rad, США). Дизайн праймеров для получения специфичных фрагментов гена *SMC2* (НН3) осуществлялся с помощью программы Primer 3. Анализ последовательности исследуемых генов проводили с помощью Ensembl в формате FASTA. Реакционная смесь для проведения ПЦР в 20 мкл содержала: 2x SNP Genotyping мастер микс, по 0,25–0,5 мкМ каждого праймера и 15 нг геномной ДНК. Программа амплификации: 95 °С — 10 мин; 95 °С — 10 с; 59 °С — 30 с; 62 °С — 30 с (40 циклов). Мультиплексную ПЦР по генам *SLC35A3* (ННС) и *ITGB2* (ННВ), проводили в 25 мкл реакционной смеси, которая содержала: 10 мкл разбавителя, 0,5 мкл *Taq*-

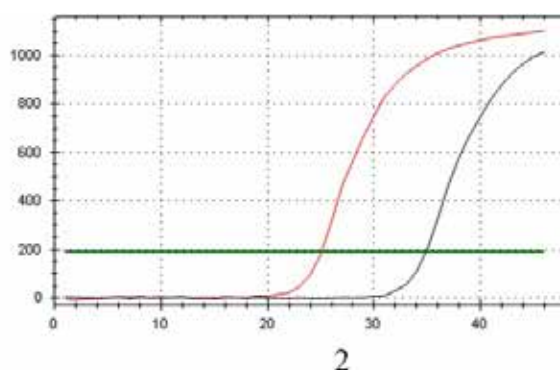
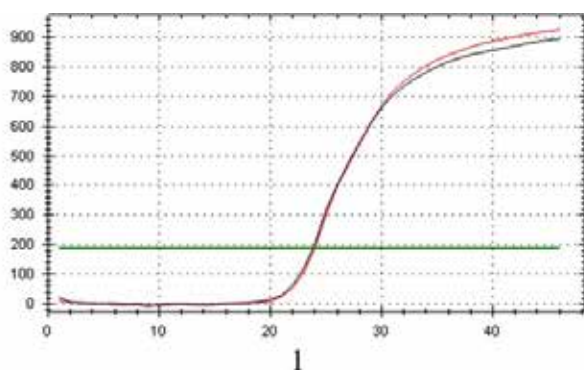


Рис.6. Выявление полиморфизма 3404Т > С в гене *SMC2* с помощью аллель-специфической ПЦР-РВ по: 1 — животное-носитель мутантного аллеля (НН3С), $\Delta Ct = +0.2$; 2 — здоровое животное (НН3Т), $\Delta Ct = -10.3$

полимеразы и 5 нг геномной ДНК. Программа амплификации: 95 °С — 3 мин; 95 °С — 15 с, 63 °С — 40 с (50 циклов). Анализ и учет полученных результатов ПЦР по гену *GART* (рис. 7), гену *SLC35A3* (рис. 8) и *ITGB2* (рис. 9) осуществляли с использованием программного обеспечения Bio-Rad CFX Maestro 3.1.

Секвенирование по Сэнгеру

Методом прямого секвенирования последовательности ДНК создана коллекция референтных образцов с известными генотипами по генам, ассоциированным с гаплотипами фертильности голштинского скота НН0, НН1, НН3, НН4, НН5, НСД. Специфичные ПЦР-продукты контрольных образцов изучаемых локусов генов 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: 960 °С — 1 мин (25 циклов): 960 °С — 10 с, 500 °С — 5 с, 600 °С — 4 мин; 160 °С — 5 мин. ПЦР-продукты после секвенирующей ПЦР очищали от непрореагировавших флуоресцентно-меченых терминаторных нуклеотидов переосаждением этанолом/ $\text{Na}_2\text{ЭДТА}$. Определение нуклеотидной последовательности проводили на приборе 3500 Genetic Analyzer («Applied Biosystems», США). Генотипирование референтных образцов показало полное совпадение результатов, полученных посредством секвенирования по Сэнгеру.

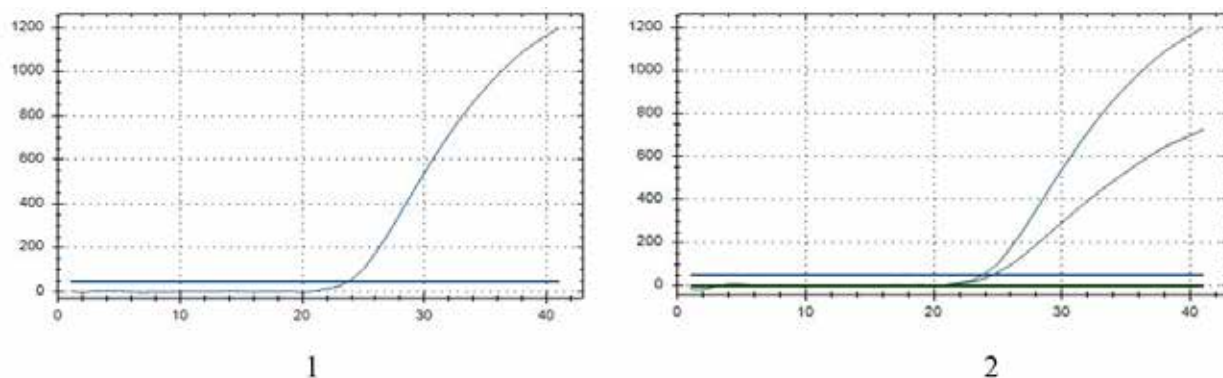


Рис.7. Выявление полиморфизма 869A > C в гене *GART* методом ПЦР-РВ: 1 — животное-носитель мутантного аллеля (NN4C); 2 — здоровое животное (NN4T)

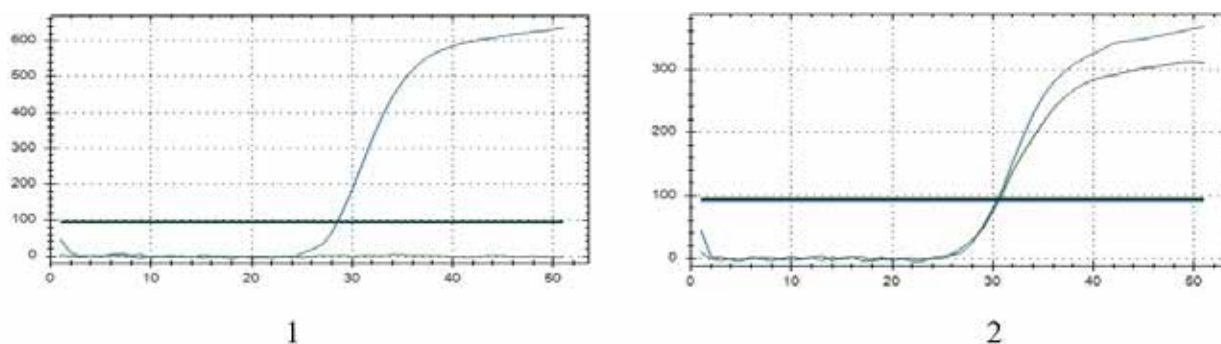


Рис.8. Выявление полиморфизма 538G > T в гене *SLC35A3* методом ПЦР-РВ: 1 — здоровое животное (CVF или NN4T); 2 — животное-носитель мутантного аллеля (CVC или NN4C)

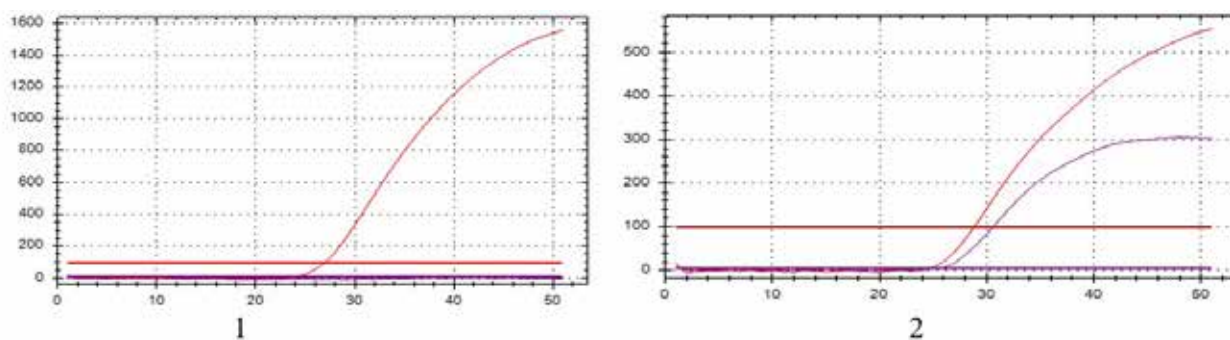


Рис.9. Выявление полиморфизма 416A > G в гене *ITGB2* методом ПЦР-РВ: 1 — здоровое животное (BLF или NN4T); 2 — животное-носитель мутантного аллеля (BLC или NN4C)

Результаты и обсуждение

С помощью разработанных нами методов была исследована выборка ($n = 4\,101$ гол.) крупного рогатого скота голштинской породы, разводимой в Республике Беларусь. Совместно с «Белплемяживобъединением» и областными селекционно-генетическими центрами впервые в Беларуси был сформирован банк данных

племенных животных с отметкой о наличии/отсутствии носительства генетических дефектов. Анализ генетической структуры популяции голштинской породы белорусской селекции показал, что из исследованных животных 305 были носителями одного генетического дефекта и 13 носителями двух дефектов. Оценена частота встречаемости гаплотипов фер-

тильности НН0, НН1, НН3, НН4, НН5, НСD, ННС, ННВ и ННD в белорусской популяции (табл. 2).

В белорусской популяции голштинов выявлено 91 животное-носитель ВУС или ННОС. Частота мутантного аллеля гена *FANCI* в выборке белорусской популяции скота (2 662 гол.) составляет 1,74%; частота животных-носителей мутации составила 3,42%, в выборке коров — 8,26% и быков — 2,37%. Аналогичные данные были получены А. Khatib с соавторами, которые показали, что частота встречаемости животных-носителей мутантного аллеля в выборке

быков составила 3,97% и в выборке коров — 4,52% в российской популяции голштинского скота [27]. Согласно литературным данным Fang, при исследовании китайской популяции в 2013 году, была выявлена частота встречаемости ВУС 4,9% у быков и 2,2% у коров [5], а в исследовании VanRaden и др. в 2011 году в США частота ВУС составила 6,0% [10]. Согласно исследованию С. Briano-Rodriguez в Уругвае в 2021 году 3,39% выборки телят составили носители гаплотипа фертильности (ВУС) [30].

Из 1 029 гол. проанализированных живот-

Таблица 2

Частоты встречаемости аллелей и генотипов исследуемых гаплотипов фертильности в белорусской популяции голштинского крупного рогатого скота

Гаплотип	Кол-во протестированных жив., гол.			Кол-во животных-носителей, гол.			Частота животных-носителей, %			Частота мутантного аллеля, %		
	Всего	Быков	Коров	Всего	Быков	Коров	Всего	Быков	Коров	Всего	Быков	Коров
НН0	2 662	2 190	472	91	52	39	3,42	2,37	8,26	1,74	1,19	4,13
НН1	1 029	573	456	29	7	22	2,82	1,22	4,82	1,41	0,61	2,41
НН3	1 041	585	456	39	17	22	3,75	2,91	4,82	1,87	1,45	2,41
НН4	1 025	569	456	6	1	5	0,59	0,18	1,10	0,29	0,09	0,55
НН5	1 022	566	456	24	9	15	2,35	1,59	3,29	1,17	0,80	1,64
НСD	1 497	747	750	33	21	12	2,2	2,81	1,60	1,10	1,41	0,80
ННС	3 979	2 754	1 225	102	58	44	2,56	2,10	3,60	1,28	1,05	1,80
ННВ	3 979	2 754	1 225	26	12	14	0,65	0,44	1,14	0,33	0,22	0,57
ННD	3 257	2 307	950	0	0	0	—	—	—	—	—	—

ных (по первому гаплотипу фертильности) 29 гол. были носителями мутации в гене *APAF1* (НН1С), 22 гол. — среди быкопроизводящих коров и 7 гол. — в выборке племенных быков. Частота встречаемости животных-носителей мутации составила 2,82% в популяции, в выборке быков — 1,22% и в выборке коров — 4,82% (табл. 2). Частота мутантного аллеля гена *APAF1* в популяции составляет 1,41% (табл. 2). Эта частота выше, чем в исследовании, проведенном Segelke D. и соавторами в 2016 году в популяции немецких голштинов, где частота составила всего 0,88% [31]. Согласно литературным данным А. Khatib с соавторами, частота встречаемости животных-носителей мутации в выборке быков составила 1,71%, а в выборке коров российской популяции — 6,39% [27]. В результате исследования

2021 года С. Briano-Rodriguez в Уругвае показано, что 4,44 % выборки телят составили носители гаплотипа фертильности НН1С [30].

В исследованной выборке животных (1 041 гол.) выявлено 39 животных-носителей НН3С, частота встречаемости животных-носителей составила 3,75% в популяции, в выборке коров — 4,82%, в выборке быков — 2,91% (табл. 2). Аналогичные данные получены при исследовании популяции голштинов в Уругвае, где частота носителей гаплотипа фертильности НН3С составила 3,13% [30]. Также наши данные соотносятся с данными полученными исследователями в таких странах, как Россия — 2,88% [27], США — 2,95% [32], Франция — 3,1% [33] и Германии — 3,29% [31].

При генотипировании 1 025 гол. по четвертому гаплотипу фертильности выявлено

6 животных-носителей НН4С, 5 из которых в выборке быкопроизводящих коров и один племенной бык. Частота встречаемости животных-носителей составила 0,59% в популяции, в выборке быков — 0,18% и среди коров — 1,1% (табл. 2). Частота мутантного аллеля гена *GART* (0,29%) в белорусской популяции оказалась ниже, чем в других странах. Так, согласно исследованию С. Briano-Rodriguez, в уругвайской выборке молодняка 1,04% составили носители гаплотипа фертильности НН4С [30]. Согласно исследованию Fritz с соавторами, проведенному в 2013 году во Франции, частота встречаемости НН4С составила 3,6% [16]. В популяции российской черно-пестрой породы частота НН4С составила 1,14%, у голштин США — 0,37% [32], в популяции французских голштинов — 4,4% [33].

В результате ДНК-диагностики 1 022 гол. из белорусской популяции было выявлено 24 особи скрытых носителей НН5С в популяции, 15 из которых выявлены в выборке быкопроизводящих коров и 9 гол. в выборке племенных быков. Частота встречаемости животных-носителей мутантного аллеля гена *TFB1M* в популяции составила 2,35%, в выборке быков — 1,59%, у быкопроизводящих коров — 3,29% (табл. 2). Аналогичная частота встречаемости НН5С составила 2,23%; 2,22%; 2,76% и 1,9% в России, США, Германия и Франция соответственно [27, 32, 31, 33]. С. Briano-Rodriguez в уругвайских телят выявлено 0,26% носителей гаплотипа фертильности НН5С [30]. В немецком поголовье Schütz с соавторами в 2016 году выявили 5,5% частоту животных-носителей мутации гена *TFB1M* [17].

Анализ генотипирования 1 497 гол. скота выявил 33 особи-носителя мутации гена *APOB*, в популяции частота животных-носителей НСДС составила 2,2%; в выборке коров — 1,6%; быков — 2,81%. Похожие данные были получены С. Briano-Rodriguez в Уругвае, где 2,61 % составили носители гаплотипа фертильности НСДС [30]. В исследовании А. Khatib с соавторами, показана большая частота встречаемости животных-носителей мутантного аллеля, которая составила 5,66%. Также похожая тенденция с большой частотой животных-носителей выявлена в выборке быков — 6,83% и меньшая у коров — 2,61%, по сравнению с другими гаплотипами. Ре-

зультаты генотипирования немецкой голштино-фризской популяции показывают частоту НСДС — 6,7% [17] и США — 2,5% [32].

При проведении ДНК-диагностики 3 979 гол. КРС, выявлено 102 гол. носителей СВС или ННСС в белорусской популяции, в выборке быкопроизводящих коров — 44 гол. и в выборке племенных быков — 58 гол. Частота встречаемости животных-носителей мутантного аллеля гена *SLC35A3* составила 2,56% в популяции; в выборке быков — 2,1% и в выборке коров — 3,6% (табл. 2). В Уругвае 2,09% носители гаплотипа фертильности СВС [30]. В 2010 г. в России частота животных-носителей мутации гена *SLC35A3* составила 1%, в турецкой популяции — 3,4% [34].

При проведении ДНК-диагностики 3 979 гол. голштинского скота в Беларуси выявлено 26 гол. носителей мутации гена *ITGB2* в популяции, в выборке быкопроизводящих коров — 14 гол. и в выборке племенных быков — 12 гол. Частота животных-носителей мутантного аллеля *ITGB2* в белорусской популяции составила 0,65%, в выборке быков — 0,44%, у коров — 1,14% (табл. 2). Согласно исследованиям М. Gozdek с соавторами, в популяции польского голштинского скота частота встречаемости ВЛС или ННВС-носителей мутации гена *ITGB2* составила 0,21% [29]. Из данных С. Briano-Rodriguez в Уругвае частота носителей гаплотипа фертильности ВЛС — 1,04% [30]. Похожие данные получены и в России, где частота ВЛС составила 0,94% [27]. Это указывает на тот факт, что скрининг племенных животных, проводимый во многих странах в течении более чем 20 лет, позволил снизить частоту встречаемости животных-носителей гаплотипа фертильности ННВ.

В ходе исследований 3 257 гол. белорусской популяции животных-носителей мутации дефицита уридинмонофосфатсинтетазы (ННД) выявлено не было. Аналогичные данные показывают М. Gozdek с соавторами (2020). В популяции польского голштинского скота не были выявлены животные носители (DPC) мутации гена *UMPS* [29]. В популяции российских голштинов также не выявлены носители гаплотипа фертильности ННД [27]. Поскольку данное наследственное заболевание КРС исследуют с 1993 года, вероятно, что за такое продолжительное время все носители данного

генетического дефекта были выявлены и выведены из селекционного процесса. С 2020 года Минсельхозпрод Беларуси исключил гаплотип ННД из перечня обязательных к тестированию заболеваний КРС.

Схожие данные частоты животных-носителей гаплотипов фертильности в популяциях голштинского крупного рогатого скота в разных странах свидетельствуют об интенсивной селекции на увеличение молочной продуктивности с использованием спермы выдающихся быков-производителей мировой селекции. Таким образом, поток мутантных генов среди голштинской породы, в том числе и в белорусской популяции, происходит через криоконсервированную сперму в результате искусственного осеменения. Различие частоты животных-носителей летальных гаплотипов фертильности у коров (НН0 — 8,26%; НН1 — 4,82%; НН3 — 4,82%; НН4 — 1,10%; НН5 — 3,29%; ННС — 3,60%; ННВ — 1,14%) по сравнению с быками (НН0 — 2,37%; НН1 — 1,22%; НН3 — 2,91%; НН4 — 0,18%; НН5 — 1,59%; ННС — 2,81%; ННВ — 0,44%) можно объяснить тем, что в основном диагностика генетически обусловленных наследственных заболеваний проводится предпочтительно у поголовья быков-производителей и реже у быкопроизводящих коров, вследствие чего мутантные аллели накапливаются в поголовье коров. Дальнейшее распространение мутантных аллелей, вызывающих снижение фертильности животных, может быть связано с использованием гетерозиготных быкопроизводящих коров.

В исследованной выборке белорусского скота были выявлены 13 животных (табл. 3) парных носителей двух разных гаплотипов фер-

тильности, которые они получили от одного или обоих родителей. Животных-носителей трех и более генетических дефектов в своем геноме выявлено не было. Из 39 животных-носителей НН3 трое были также носителями пятого гаплотипа фертильности (НН5), двое — носителями дефекта холестерина (НСД) и один — носитель комплексного порока позвоночника (ННС). Каждая группа животных-носителей того или иного гаплотипа, включала по крайней мере от 1 до 3 носителей других гаплотипов фертильности. Несмотря на большое количество носителей СVС (гаплотип ННС) (102 особи), только одна из них была носителем третьего гаплотипа фертильности (НН3) и две — носителями дефицита адгезии лейкоцитов (гаплотип ННВ). Другие парные сочетания гаплотипов показаны в таблице 3.

Анализ результатов скрининга белорусской популяции голштинского крупного рогатого скота на носительство генетических дефектов, снижающих плодовитость (гаплотипов фертильности) по годам показан в таблице 4 и на рисунке 10.

Анализ ДНК-скрининга (2015–2021 гг.) белорусской популяции голштинского скота на носительство генетических дефектов, снижающих плодовитость животных, показал, что с годами количество животных-носителей мутантного аллеля (табл. 3), а также их частота (рис. 10) в исследуемой популяции снижается, так как выявленные особи — скрытые носители мутаций — элиминируются из селекционного процесса. Однако частота встречаемости гаплотипов фертильности НН0, НН1, НН3, НН5, НСД остается еще высокой, так как их диагностика начала проводиться недавно, и составляет у племенных животных 3,02%; 1,18%;

Таблица 3

Распространенность животных-носителей парных сочетаний гаплотипов в популяции белорусского голштинского крупного рогатого скота

	ВУС	НН1С	НН3С	НН4С	НН5С	НСД1,3	СVС/ ННСС	ВLС/ ННВС	DPС/ ННДС
ВУС	91	2	–	–	–	–	–	1	–
НН1С	2	29	–	–	1	–	–	–	–
НН3С	–	–	39	–	3	2	1	–	–
НН4С	–	–	–	6	1	–	–	–	–

Окончание таблицы 3

	ВУС	НН1С	НН3С	НН4С	НН5С	НCD1,3	СVC/ ННСС	ВLC/ ННВС	DPC/ ННDC
НН5С	–	1	3	1	24	–	–	–	–
НCD1,3	–	–	2	–	–	33	–	–	–
СVC/ ННСС	–	–	1	–	–	–	102	2	–
ВLC/ ННВС	1	–	–	–	–	–	2	26	–
DPC/ ННDC	–	–	–	–	–	–	–	–	–

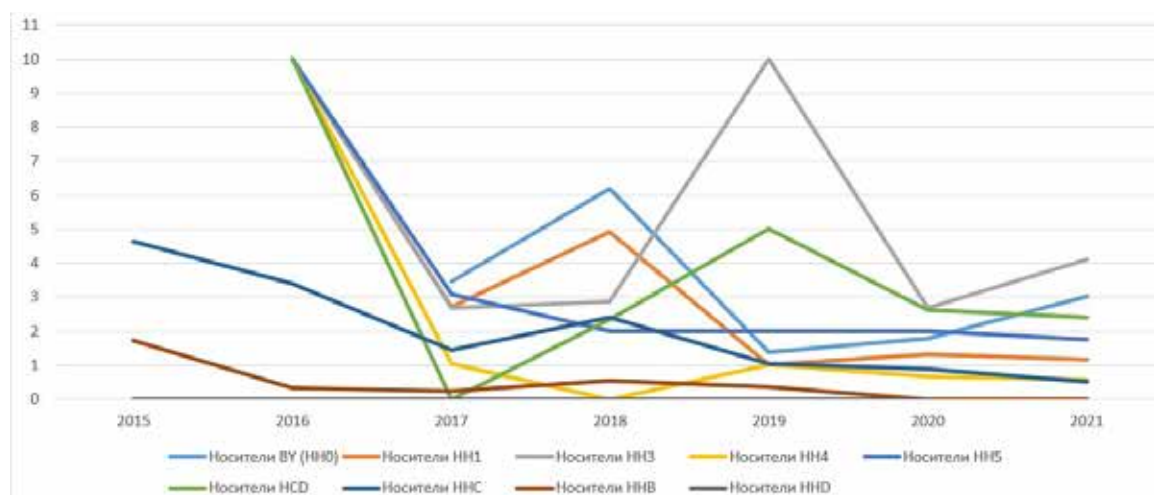


Рис.10. Мониторинг частоты встречаемости животных-носителей гаплотипов фертильности в белорусской популяции

4,12%; 1,76%; 2,41% соответственно. В то же время такие генетические дефекты как: CVM, VLAD исследуются в белорусской популяции с 2007 г. и их частота значительно снизилась с 4,63% и 1,73% соответственно в 2015 г. до 0,51 и 0,0% соответственно в 2021 г. [35].

Заключение

Проведение ДНК-диагностики наследственных генетических дефектов (НН0, НН1, НН3, НН4, НН5, НCD, ННС, ННВ и ННD) крупного рогатого скота голштинской породы белорусской селекции, которые оказывают влияние на воспроизводительные качества коров и ассоциированы с эмбриональной и ранней постэмбриональной смертностью на различных стадиях развития, позволяют выявлять животных скрытых носителей мутаций.

Выявлена частота встречаемости животных-

носителей мутантных аллелей по гаплотипу НН0 — 3,42%; НН1 — 2,82%; НН3 — 3,75%; НН4 — 0,59%; НCD — 2,35%; НН5 — 2,2%; ННС — 2,56%; ННВ — 0,65%; ННD — 0%. Учитывая распространенность изучаемых LoF-мутаций в белорусской популяции голштинского крупного рогатого скота как среди быков-производителей, так и среди племенных коров, необходимо проводить скрининг племенных животных и использовать полученные результаты в селекционно-племенной работе, что позволит при подборе родительских пар снизить вероятность получения среди потомства гомозиготных носителей мутантных аллелей.

Таким образом, ДНК-диагностика крупного рогатого скота голштинской породы белорусской селекции, направленная на выявление генетически детерминированных заболеваний,

Таблица 4
 Результаты скрининга белорусской популяции голштинского крупного рогатого скота на носительство генетических дефектов, снижающих плодовитость

Год	ВУ (НН0)		НН1		НН3		НН4		НН5		НCD		ННС		ННВ		ННД	
	n	ВУС	n	НН1С	n	НН3С	n	НН4С	n	НН5С	n	НCD1,3	n	СVC ННСС	n	ВLC ННВС	n	DPC ННДС
2015	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	1 101	51	1 101	19	1 101	0
2016	58	0	10	1	10	1	10	1	10	1	10	1	620	21	620	2	620	0
2017	921	32	295	8	297	8	292	3	292	9	291	0	832	12	832	2	850	0
2018	630	39	304	15	314	9	303	0	300	6	301	7	376	9	376	2	376	0
2019	288	4	100	1	100	10	100	1	100	2	100	5	287	3	287	1	290	0
2020	566	10	150	2	150	4	150	1	150	3	422	11	565	5	565	0	20	0
2021	199	6	170	2	170	7	170	0	170	3	373	9	198	1	198	0	0	0

позволяет выбраковать из стада животных-носителей генетических дефектов, оздоровить популяцию и, соответственно, значительно снизить экономические потери в животноводстве.

Список использованных источников

1. Barbat, A. Female fertility in French dairy breeds: current situation and strategies for improvement / A. Barbat, Le Mezc P. // *J. Reprod. Dev.* – 2010. – № 56. – P. 15–21.
2. Dobson, H. The high producing dairy cow and its reproductive performance / H. Dobson, R. F. Smith, M. D. Royal *Reprod. Domest. Anim.*, 2007. – 42 (Suppl. 2). – P. 17–23.
3. Oltenacu, P. A., Broom, D. M. The impact of genetic selection for increased milk yield on the welfare of dairy cows // *Animal Welfare.* – 2010. – 19(S). – P. 39–49.
4. Зиновьева, Н. А. Гаплотипы фертильности голштинского скота // *Сельскохозяйственная биология.* – Т. 51. – 2016. – С. 423–435.
5. Fang, L. Identification of brachyspina syndrome carriers in Chinese Holstein cattle. / L. Fang [et al] // *J Vet Diagn Invest.* – 2013. – V. 25. – P. 508–510.
6. Ruś, A. Detection of Brachyspina carriers within Polish Holstein-Friesian bulls / A. Ruś, S. Kamiński // *Polish Journal of Veterinary Sci.* – 2015. – Vol. 18, No. 2. – P. 453–454.
7. Брахиспина — наследственная аномалия, снижающая плодовитость крупного рогатого скота / М. Е. Михайлова, А. И. Киреева, Е. Л. Романишко // сборник научных трудов «Факторы экспериментальной эволюции организмов», Українське товариство генетиків і селекціонерів ім. М. І. Вавилова. – Том 22. – 2018. – С. 149–152.
8. Agerholm, J. S. Familial occurrence of Danish and Dutch cases of the bovine brachyspina syndrome / J. S. Agerholm, K. Peperkamp // *Veterinary Research.* – 2007. – 3:8. – P. 6.
9. Testoni, S. Brachyspina syndrome in two Holstein calves / S. Testoni, A. Diana, E. Olzi, A. Gentile // *The Veterinary Journal.* – 2007. – V 177. – Issue 1. – P. 144–146.
10. Van Raden, P. M. Harmful recessive effects on fertility detected by absence of homozygous haplotypes / P. M. Van Raden, K. M. Olson // *J. Dairy Sci.* – 2011. – № 94. – P. 6153–6161.
11. Cooper, T. A. Genomic evaluation of Ayrshire dairy cattle and new haplotypes affecting fertility and stillbirth in Holstein, Brown Swiss and Ayrshire breeds / T. A. Cooper, G. R. Wiggans, P. M. Van Raden // *JAM.* – 2013. – С. 206.
12. De Zio D. *Apafl* in embryonic development — shaping life by death, and more / De Zio D., Maiani E., Cecconi F. // *Int. J. Dev. Biol.* – 2015. – 59(1–3). – P. 33–39.
13. М. Е. Михайлова, Е. Л. Романишко, А. И. Киреева. Детекция полиморфизма rs456206907 гена *SMC2*, детерминирующего гаплотип фертильности hh3 у крупного рогатого скота / *Молекулярная и прикладная генетика.* – 2018. – Т. 25. – С. 67–72.
14. Mc Clure M. C., Bickhart D., Null D., Bovine exome sequence analysis and targeted SNP genotyping of recessive fertility defects BH1, HH2 and HH3 reveal causative mutation in *SMC2* for HH3 // *PLoS ONE.* – 2014. – 9. – P. 125–130.
15. Daetwyler, H. D. Whole-genome sequencing of 234 bulls facilitates mapping of monogenic and complex traits in cattle // *Nature Genet.* – 2014. – № 46. – P. 858–865.
16. Fritz, S. Detection of haplotypes associated with prenatal death in dairy cattle and identification of deleterious mutations in *GART*, *SHBG* and *SLC37A2* / S. Fritz, A. Capitan, A. Djari // *PLoS ONE.* – 2013. – P. 8(6).
17. Schütz, E. The Holstein Friesian lethal haplotype 5 (HH5) results from a complete deletion of *TBF1M* and *CDH* from an *ERV-(LTR)* insertion into the coding region of *APOB* / E. Schütz, C. Wehrhahn, M. Wanjek // *PLoS ONE.* – 2016. – 11(4). – P. 154–160.
18. Menzi, F. A transposable element insertion in *APOB* causes cholesterol deficiency in Holstein cattle / F. Menzi, N. Besuchet, M. Fragniere // *AnimGenet.* – 2016. – № 47. – P. 253–257.
19. Зиновьева, Н. А. Дефицит холестерина — новый рецессивный генетический дефект голштинского скота / Н. А. Зиновьева, О. В. Костюнина, В. В. Волкова // *Молочное и мясное скотоводство.* – 2016. – С. 5–8.
20. Thomsen, B., Horn, P., Panitz, F., Bendixen, E., Petersen, AH., Holm, LE., Nielsen, VH., Agerholm, JS., Arnbjerg, J., Bendixen, C. A missense mutation in the bovine *SLC35A3* gene, encoding a UDP-N-acetylglucosamine transporter, causes complex vertebral malformation. // *Genome Res.* – 2006 – Т. 16 – С. 97–105.
21. Malher, X., Beaudeau, F., Philipot, JM. Effects of sire and dam genotype for complex vertebral malformation (CVM) on risk of return-to-service in Holstein dairy cows and heifers // *Theriogenology* –

2006 – Т. 65 – С. 1215–1225.

22. <http://www.vgnki.ru/assets/files/broshyura-otestah-golshhtinskoj-porody.pdf>

23. Shuster, D. E., Kehrli, M. E., Ackermann, M. R., Gilbert, R. O. Identification and prevalence of a genetic defect that causes leukocyte adhesion deficiency in holstein cattle // Proceedings of the national academy of sciences of the USA – 1992 – Т. 89 – С. 9225–9229.

24. Healy, P. J. Bovine Leucocyte Adhesion Deficiency (BLAD) — Another Genetic Defect of Holstein/Friesians // Australian Veterinary Journal – 1992 – Т. 69 – С. 190.

25. Михайлова, М. Е. ДНК-технология выявления мутации, обуславливающей развитие наследственного заболевания DUMPS — ранняя абортруемость эмбрионов крупного рогатого скота: методич. рекомендации / М. Е. Михайлова, А. И. Киреева, Е. Л. Романишко. — Институт генетики и цитологии НАН Беларуси. — Минск, 2016. — 8 с.

26. Identification of brachyspina syndrome carriers in Chinese Holstein cattle / L. Fang, Y. Li, Y. Zhang, et. all // J. of Veterinary Diagnostic Investigation. — 2013. — № 25. — P. 508–510.

27. Усенбеков, Е. С Детекция точечной мутации у быков-производителей методом полимеразной цепной реакции / Е. С. Усенбеков // Актуальные проблемы ветеринарного акушерства и репродукции животных. — Горки. — 2013. — С. 146–153.

28. The distribution of lethal Holstein haplotypes affecting female fertility among the Russian Black-and-White cattle A. Khatib, A. M. Mazur, E. Prokhortchouk // EurAsian Journal of BioSciences. — 2020. — № 14. — P. 2545–2552.

29. M. Gozdek Report on the incidence of hereditary disorders (BLAD, DUMPS) in the Polish

population of Holstein-Friesian cattle / M. Gozdek, M. Kolenda, D. Kamola // Acta Sci. Pol. Zootechnica. — 2020. — № 19(3). — P. 15–22.

30. C. Briano-Rodriguez Lethal and semi-lethal mutations in Holstein calves in Uruguay Mutações letais e semi-letais em bezerros da raça Holandesa no Uruguai / C. Briano-Rodriguez, A. Romero, S. Llambí et all // Ciência Rural. — 2021. — v. 51. — №. 7. — P. 1–7.

31. Segelke D. Considering genetic characteristics in German Holstein breeding programs / D. Segelke, H. Taubert, F. Reinhardt et all // J. of dairy science. — 2016. — № 99(1). — P. 458–467.

32. Cole, J. B. Phenotypic and genetic effects of recessive haplotypes on yield, longevity, and fertility / Cole, J. B., Null, D. J., VanRaden, P.M. // J Dairy Sci. — 2016. — № 99(9). — P. 7274–7288.

33. Fritz, S. An initiator codon mutation in SDE2 causes recessive embryonic lethality in Holstein cattle / S. Fritz, C. Hoze, E. Rebours // J. of dairy science. — 2018. — 101. — P. 6220–6231.

34. Meydan, H. Screening for bovine leukocyte adhesion deficiency, deficiency of uridine monophosphate synthase, complex vertebral malformation, citrullinaemia, and factor XI deficiency in Holstein cows reared in Turkey // Acta Veterinaria Scandinavica. — 2010. — № 52, 56.

35. М. Е. Михайлова, Р. И. Шейко, А. И. Киреева, Е. Л. Романишко, Н. А. Камыш, Н. И. Тиханович, О. А. Беляк, А. Н. Баяхов ДНК-скрининг рецессивных мутаций, обуславливающих развитие наследственных дефектов (BLAD- и SVM-синдромов) в популяции КРС в Беларуси / Молекулярная и прикладная генетика: сб. науч. тр. / Институт генетики и цитологии НАН Беларуси. — Минск: Институт генетики и цитологии НАН Беларуси. — 2019. — Т. 27. — С. 90–96.

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

IDENTIFICATION OF FERTILITY HAPLOTYPES IN THE BELARUSIAN POPULATION OF HOLSTEIN 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

Long-term artificial selection of highly productive breeding animals, latent carriers of genetic diseases, has led to the accumulation of recessive mutations in the cattle population. Since 2007, the Laboratory of Animal Genetics has been researching the fertility haplotypes of Holstein cattle (HHC, HHB, and HHD), and since 2016, the Laboratory has started additional research by other haplotypes (HH0, HH1, HH3, HH4, HH5, HCD) that affect reproductive traits and are associated with embryonic and early postembryonic death of calves. Earlier developed methods allowed us to identify mutations in the *FANCI*, *APAF1*, *SMC2*, *GART*, *TFB1M*, *SLC35A3*, *ITGB2*, *APOB*, and *UMPS* genes associated with these haplotypes. Monitoring cattle populations in Belarus ($n = 4101$ heads) made it possible to reveal the frequency of occurrence of the hidden carriers of mutant alleles of the HH0 haplotype amounting to 3.42%, HH1 — 2.82%, HH3 — 3.75%, HH4 — 0.59%, HCD — 2.35%, HH5 — 2.2%, HHC — 2.56%, HHB — 0.65%, and HHD — 0%. We believe that further DNA diagnostics of foreign and domestic breeding will allow diminishing the spread of genetic defects that degrade the reproductive qualities of cattle.

Keywords: Cattle, genetic defects, DNA testing, fertility haplotypes, *APAF1*, *SMC2*, *GART*, *TFB1M*, *APOB*, *FANCI*, *SLC35A3*, *ITGB2*, *UMPS*.

Дата поступления статьи: 13 сентября 2021 г.

О. Г. Бабак¹, Е. В. Дрозд¹, Н. А. Некрашевич¹, Н. В. Анисимова¹, К. К. Яцевич¹, И. Е. Баева²,
И. Г. Пугачева², А. В. Французенок², М. М. Добродькин², А. В. Кильчевский¹

ОЦЕНКА И ПРИМЕНЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАРКЕРОВ В СЕЛЕКЦИИ НА УСТОЙЧИВОСТЬ ТОМАТА (*SOLANUM LYCOPERSICUM* L.) К ФИТОФТОРЕ (*PHYTOPHTHORA INFESTANS*)

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

²Учреждение образования
«Белорусская государственная сельскохозяйственная академия»
Республика Беларусь, 213407, Могилевская область, г. Горки, ул. Мичурина, 5

Оценена эффективность известных в литературе молекулярных маркеров аллелей резистентности к *Phytophthora infestans* с целью применения методов маркер-сопутствующей селекции (MAC) при создании устойчивых к фитофторозу гибридов и сортов томата. Установлена высокая эффективность выявления гомозиготных и гетерозиготных форм по генам *Ph2* и *Ph3* с помощью CAPS dTG63 (*HinfI*) и SCAR NCLB-9-6678 маркеров соответственно. Адаптированы методики выделения ДНК, составы реакционных смесей, режимы амплификации и визуализации результатов. Показано наличие аллеля *Ph3* в гибридах F₁-стандартах Адапт и Аламина, в гибридах F₁ Азарт, Агеньчик, Дзивосны, Блэк Бриллиант, внесенных в Реестр сортов Республики Беларусь, а также в селекционных линиях из коллекций Института генетики и цитологии НАН Беларуси и Белорусской государственной сельскохозяйственной академии.

Ключевые слова: томат, устойчивость к фитофторе, *Phytophthora infestans*, ДНК-маркеры.

Введение

Фитофтороз (late blight), вызываемый грибами класса *Oomycetes* рода *Phytophthora*, является наиболее опасной болезнью для ряда важнейших сельскохозяйственных культур во всем мире [1, 2]. В настоящее время грибы рода *Phytophthora* наносят ущерб картофелю; томату (*P. infestans*); яблоне (*P. cactorum*); сое (*P. sojae*) и другим растениям (*P. ramorum*, *P. cinnamomi*, *P. palmivora*) [3, 4, 5]. Появившись впервые на картофеле в 1840-х годах почти одновременно в США и Европе вследствие высокой внутрипопуляционной изменчивости, возбудитель *Phytophthora infestans* широко распространился и на томат, относящийся, как и картофель, к семейству пасленовых. Размножаясь половым и бесполом путем при высокой влажности (75–80%) или наличии капельной влаги, при умеренных температурах (15–25 °С), возбудитель при единичном начальном заражении может образовать несколько десятков тысяч спорангиев [6]. Дан-

ное свойство обеспечивает лавинообразный характер развития болезни. В благоприятных условиях окружающей среды болезнь может повредить все надземные части растений томатов в течение 7–10 дней [2] и привести к 100% потере урожая [6]. *Phytophthora infestans* уже около 170 лет является объектом изучения ботаников, физиологов, фитопатологов, генетиков и селекционеров. Однако и в третьем тысячелетии сохраняется потенциальная опасность эпифитотии фитофтороза.

Сохранение урожая томата от грибных болезней осуществляется двумя основными путями — посредством применения защитных препаратов (преимущественно фунгицидов) и отбором устойчивых растений. Применение фунгицидов может приводить к негативным экологическим последствиям, в частности, к изменению состава почвенных микроорганизмов или появлению агрессивных рас возбудителя, устойчивых к используемым препаратам. В литературе представлен ряд публикаций,

описывающих появление новых штаммов *Ph. infestans*, преодолевающих защиту, создаваемую применяемыми фунгицидами [7, 8].

Генетическая устойчивость растений-хозяев является важнейшим способом защиты от патогенов. Поиск устойчивых форм долгие годы осуществлялся с использованием различных фитопатологических методов при полевой и лабораторной оценках. С развитием молекулярного анализа неоспоримую роль стал играть направленный поиск ценных генов, контролирующих устойчивость к болезням. К настоящему моменту описаны три основных гена устойчивости к фитофторозу: *Ph1*, *Ph2* и *Ph3*, установлена их локализация на 7, 10 и 9 хромосомах соответственно, описаны их источники в диких формах и культурном томате [9, 10], изучена структура устойчивых и неустойчивых аллелей [11, 12], разработаны молекулярные маркеры для типирования форм на наличие устойчивых аллелей *Ph2* и *Ph3* [13, 14]. Согласно литературным данным, ген *Ph2* является эффективным против расы T-1 *P. infestans*, и чаще его ассоциируют со снижением скорости распространения заболевания [15]. Самым сильным геном устойчивости из вышеописанных является *Ph3*, который в доминантном состоянии обеспечивает устойчивость к широкому спектру изолятов *Ph. infestans* [16]. Анализ его первичной структуры показал, что он кодирует CC-NBS-LRR (coiled-coil nucleotide-binding leucine-rich repeat) — белок, который принадлежит к обширному классу NBS-LRR растительных R-генов [17]. Однако даже этот ген не обеспечивает устойчивости к высокоагрессивным изолятам фитофтороза. Наиболее эффективным считается сочетание двух генов *Ph2* и *Ph3*, которые были объединены в ряде товарных сортов с использованием разработанных ДНК-маркеров [17, 18].

Наряду с данными тремя генами, используемыми в селекции, в настоящее время продолжается поиск новых источников устойчивости к фитофторозу. Имеются данные о выявлении новых генов устойчивости. Так, С. Kole с соавторами [19] сообщают о выявлении гена *Ph4*, расположенного на хромосоме 2 у дикого вида *S. habrochaites*; Н. Merk с соавторами [20] — о новых источниках устойчивости *Ph5-1* и *Ph5-2*, расположенных на первой

и десятой хромосомах соответственно. Однако сведений о разработке к ним маркеров и создании сортов *S. lycopersicum*, несущих указанные гены, пока нет.

В связи с этим целью наших исследований являлись апробация и адаптация известных SCAR маркеров к генам устойчивости к фитофторозу *Ph2* и *Ph3*, оценка селекционного материала, используемого белорусскими селекционерами, а также вовлечение аллелей устойчивости в новые создаваемые сорта и гибриды для защищенного и открытого грунта.

Материалы и методы исследования

В качестве исследуемого материала использовались образцы томата для открытого и защищенного грунта коллекций Института генетики и цитологии НАН Беларуси и Белорусской государственной сельскохозяйственной академии: сорта, гибриды F_1 , отборы из популяций F_2 – F_6 , а также коммерческие сорта и гибриды, используемые в качестве стандартов при оценке образцов томата в государственном сортоиспытании.

Коллекция открытого грунта включала следующие образцы: гибрид F_1 Адапт, 30 гибридов F_1 , полученных по схеме топкросса, сорта Ирма, Zafar, Доходный, Желтый жемчуг, Спажытак, Звездапад, Дивиденд, Источник, Корнет, Клондайк, Акварель, 67 селекционных линий F_5 – F_8 .

Коллекция образцов для защищенного грунта включала следующие формы крупноплодного томата и томата черри: гибриды F_1 Евро, Старт, Аламина, Александр, Азарт, Дзивосны, Блэк бриллиант, Беларуски малинавы, Индиго х 19/19-6, сорта Никола, Иришка, Индиго, Малиновый коктейль, Линия 14, Линия-94, Линия ТХ-140, Линия ТХ-144, Линия Б-3-1-8, Линия-4, Линия С-9464, Линия 19/0, Линия 19/3, Линия-2, Линия-9 (F_1), № 20/2021 (F_7), 4 популяции F_5 – F_6 томата черри на основе ФМС, популяции F_2 Т39 и Т40.

Выделение ДНК проводили с использованием набора для выделения ДНК из растительного материала комплектации С компании «Прайм-тех» согласно протоколу производителя.

При апробации молекулярных маркеров, представленных в таблице 1, использовали реактивы, предлагаемые белорусскими компаниями. Для приготовления 15 мкл апробаци-

онной реакционной ПЦР смеси использовали: 50 нг ДНК, 250 нМ каждого из пары праймеров, 200 нМ dNTP, 7,5 мкл 2x PCR буфера для Tornado ДНК-полимеразы, 0,2 мкл Tornado ДНК-полимеразы («Праймтех», «АртБиоТех») (2U/мкл). Апробационный режим проведения

амплификации включал следующие этапы: I-й этап: 92 °С — 15 мин; II-й этап: 35 циклов: 99 °С — 4 с; 52–55 °С — 30 с; 68–72 °С — 1 мин; III-й этап: 72 °С — 5 мин; IV-й этап: 16 °С — 2 мин. Оценка продуктов амплификации проводилась методом электрофореза в 2% агарозном геле.

Таблица 1

Наименование и характеристика маркеров, используемых для ДНК-типирования аллелей устойчивости к фитофторе

Ген, хромосома	Литературный источник	Тип и название маркера	Праймеры, рекомендуемая полимеразы для ПЦР	Температура отжига, °С	Ожидаемые фрагменты, R/S, п. н.
<i>Ph-2</i> , хромосома 10	D. Panthee, 2012; J. M. Lee, 2015	*CAPS, dTG63 (<i>HinfI</i>)	F: СТАСТСТТТСТАТГСААТТГААТТГ R: ААТААТТТТСААССАТАГААТГАТТ, Tornado ДНК-полимераза	55	246 / 220
<i>Ph-3</i> , хромосома 9	H. Jung Kim, 2015; J. M. Lee, 2015	SCAR, Ph3-SCAR	F: СТАСТСГТГСААГААГГТАС R: ТССАТАСАССТГССАГТТГ, Tornado ДНК-полимераза	55	176 / 154
		SCAR, NCLB-9-6676	F: АСАГААААГТГСАСГААГТТ R: АТТТГААТГТТСТГГАТТГС, <i>Taq</i> -полимераза	52	1000 / 1300
	D. Panthee, 2015	SCAR, NCLB-9-6677	F: АААГССААТАССТТАГСАСА R: АТТСААССГТСАААААСТТГ, <i>Taq</i> -полимераза	52	1000 / 1250
		*SCAR, NCLB-9-6678	F: ССТТААТГСААТАГГСАААТ R: АТТТГААТГТТСТГГАТТГГ, Tornado ДНК-полимераза	52	600 / 900
		SCAR, NCLB-9-6679	F: ТССГСТТАТАГААААГСААС R: СССАГАААСАГТТТГААСТС, <i>Taq</i> -полимераза	52	1000 / 1200

Примечание. * — маркеры, рекомендуемые по результатам апробации

Отобранные маркеры и выделенные устойчивые формы использовали для создания ценных гибридов и нового селекционного материала с комплексом аллелей хозяйственно-важных признаков.

Результаты и обсуждение

Для апробации и адаптации способа ДНК-типирования аллелей гена *Ph-2* нами использован предложенный американской группой авторов (D. Panthee с соавт., 2012) CAPS маркер dTG63 (*HinfI*) [21], который позднее применили корейские исследователи (J. M. Lee

с соавт., 2015) [14] (табл. 1). После амплификации с использованием апробационной смеси и режима ПЦР был получен ожидаемый фрагмент размером 246 пар нуклеотидов (п. н.). Реакционная смесь для рестрикции (5 мкл) включала: 2,5 мкл ампликона; 0,5 мкл R буфера; 0,2 мкл рестриктазы *HinfI*; 1,8 мкл H_2O . Инкубирование проводили при 37 °С 16 часов. После рестрикции ПЦР-продукты устойчивых форм оставались неразрезанными, а продукты восприимчивых форм разрезались на фрагменты длиной 220 и 26 п. н.

Электрофоретическое разделение продуктов

ПЦР проводили в агарозном геле плотностью 2%. Гель помещали в электрофоретическую камеру с TAE буфером таким образом, чтобы гель был погружен в буфер на 5 мм. В каждую дорожку геля вносили по 6 мкл продукта ПЦР, для оценки размера применяли маркер молекулярного веса GeneRuler™ 100 bp (Thermo Scientific).

С использованием ДНК-маркера dTG63 было оценено 58 различных образцов. Однако устойчивый фрагмент был обнаружен в гетерозиготном состоянии только у образца По-

иск 21/21 (рис. 1А, № 18, 19). Для установления более четкой разницы между фрагментами разгонка продуктов амплификации также проводилась в геле с MetaPhor-агарозой и маркером молекулярного веса с шагом GeneRuler™ 50 bp (Thermo Scientific) (рис. 1Б). Данный способ позволил выявить у образца МК1 наличие двух близких по размеру рестрикционных фрагментов, что говорит о возможном наличии иного аллеля *Ph-2*.

Апробация способов выявления аллелей гена *Ph-3* проводилась с применением пяти

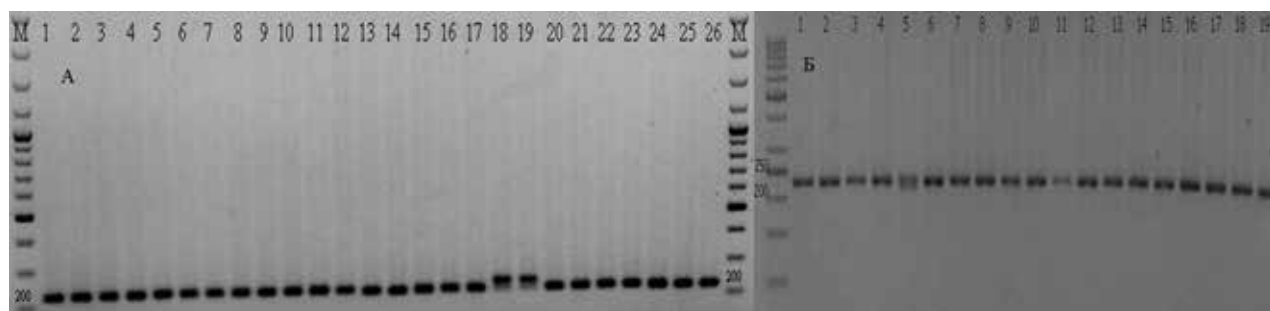


Рис. 1. Продукты рестрикции гена *Ph-2*: М — маркер молекулярного веса (100 bp (А) и 50 bp (Б))

А: 1, 2 — Ирма; 3 — 1272-1 (F_7); 4 — 1272-6 (F_7); 5–7 — С9464 × Ирешка F_1 ; 8 — Т39-3; 9 — Т39-7; 10–12 — д. 71; 13–15 — д. 108; 16, 17 — Поиск 12/21; 18, 19 — Поиск 21/21; 20, 21 — Т1/2 нм; 22, 23 — ВИР6 (Сливка красная); 24, 25 — ВИР56 (Индиго); 26 — ВИР57 (Gold berries);

Б: 1, 2 — 19/19-5 (F_6); 3, 4 — 19/19-6 (F_6); 5 — МК1; 6 — МК2; 7, 8 — Агеньчык; 9, 10 — Старт (F_1); 11, 12 — Дзівосны; 13, 14 — Блэк бриллиант; 15, 16 — Линия4; 17, 18 — Индиго × 19/19-6 (F_1)

маркеров, разработанных двумя исследовательскими группами: Ph3-SCAR (H. Jung Kim, 2015) [11], SCAR NCLB-9-6676, NCLB-9-6677, NCLB-9-6678, NCLB-9-6679 (D. Panthee с соавт., 2015) [14], (табл. 1). Данные маркеры разработаны на основе отличий в структуре устойчивых и восприимчивых аллелей 3 InDel (11 п. н., 11 п. н., 56 п. н.) и SNP G/A [11].

При использовании Ph3-SCAR маркера апробационные условия ПЦР показывали наличие ожидаемых фрагментов: ампликоны размером 176 и 154 п. н., свидетельствующие о наличии признака устойчивости и восприимчивости к фитофторе соответственно. Однако разгонка достаточно близких по размеру продуктов в обычном агарозном геле (рис. 2А) не давала четкой картины, в отличие от разгонки продуктов амплификации в геле с MetaPhor-агарозой (рис. 2Б).

При амплификации с маркерами NCLB-9-6676 и NCLB-9-6677, согласно авторам, ожидалось фрагменты 1 000 и 1 300/1 250 п. н., свидетель-

ствующие о наличии признака устойчивости и восприимчивости к фитофторе соответственно [14]. При апробационных условиях (с использованием ДНК-полимеразы Tornado) амплификация практически не проходила. Возможно, это связано с большим размером ПЦР-продукта, который сложен для синтеза ПЦР-полимеразой Tornado.

Результаты применения реакционной ПЦР смеси Mix 5x Евроген (с использованием *Taq*-полимеразы) показали синтез фрагмента размером в 1 000 п. н., при этом более крупные фрагменты не выявлялись. На рисунке 3 показаны результаты электрофореза продуктов амплификации с SCAR маркером NCLB-9-6677.

Продукты амплификации с данным маркером имели отличные от ожидаемых размеры: около 300 и 1 000 п. н. (рис. 3). При сопоставлении с результатами, полученными с другими маркерами, наличием ампликонов размерами 300 и 1 000 п. н. характеризовались восприимчивые формы, у устойчивых наблюдался

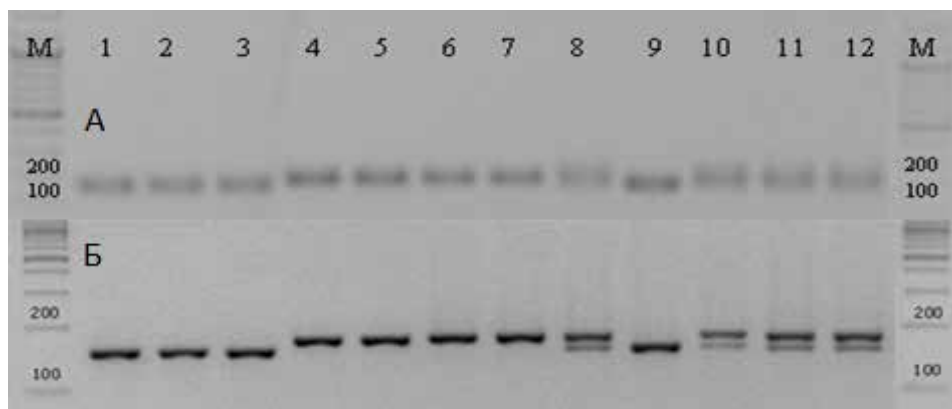


Рис. 2. Продукты амплификации ДНК образцов с Ph3-SCAR маркером в обычном агарозном геле (А) и в геле с MetaPhor-агарозой (Б): М — маркер молекулярного веса (100 bp DNA ladder (BRL)); 1–3 — Ирма; 4–9 дел. 1272 2020 БГСХА; 10–12 — С9464 × Иришка (F_1)

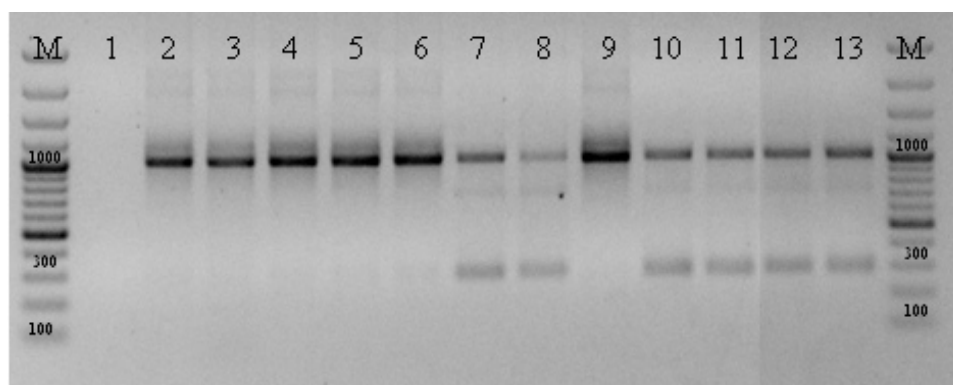


Рис. 3. Продукты амплификации ДНК образцов с SCAR маркером NCLB-9-6677: М — маркер молекулярного веса массы (100 bp); 1 — отрицательный контроль; 2–9 — дел. 1272 2020 БГСХА (F_1); 10, 11 — Ирма; 12, 13 — Ред Грант

продукт размером 1 000 п. н., при этом выявить гетерозиготные формы не представлялось возможным.

При амплификации с маркером NCLB-9-6678, согласно авторам, ожидалось фрагменты 600 и 900 п. н., свидетельствующие о наличии при-

знака устойчивости и восприимчивости к фитофторе, соответственно [14]. В результате амплификации с апробационной ПЦР-смесью (рис. 4), а также смесью с использованием *Taq*-полимеразы (рис. 5) были получены заявленные автором фрагменты. Данный маркер, как

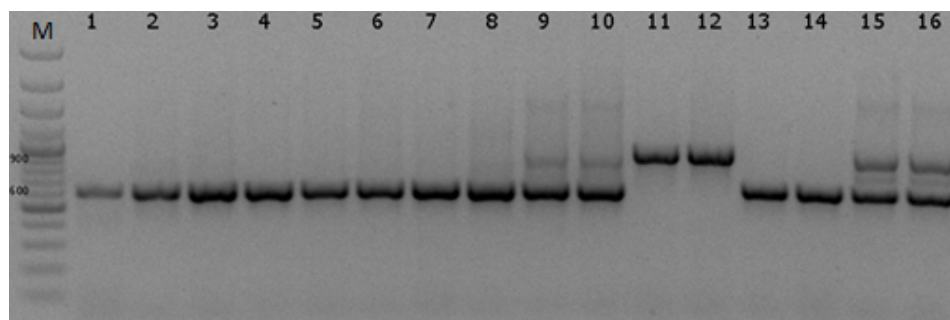


Рис. 4. Продукты амплификации ДНК образцов с SCAR маркером NCLB-9-6678: М — маркер молекулярного веса массы (100 bp); 1 — Агеньчык; 2 — 19/19-6; 3 — Индиго × 19/19-6 (F_1); 4 — № 20/2021 (F_1); 5, 6 — № 86/2021 (F_2); 7, 8 — № 87/2021 (F_2); 9, 10 — Аламина (F_1); 11, 12 — Старт (F_1); 13, 14 — № 1/2021 (Блэк бриллиант); 15, 16 — № 14/2021 (Дзивосны)

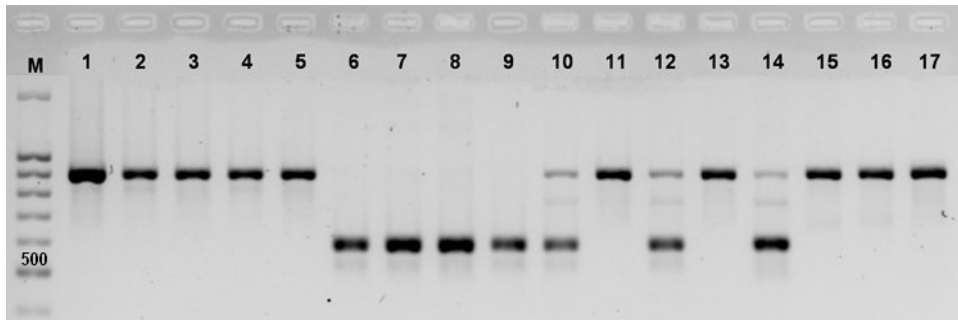


Рис. 5. Продукты амплификации ДНК образцов с SCAR маркером NCLB-9-6678: М — маркер молекулярного веса (100 bp); 1 — Линия 16-8; 2 — Zafar; 3 — Линия 217; 4 — Линия 221; 5 — Линия 19-652; 6 — Корнет; 7 — Желтый жемчуг; 8 — Линия 1476; 9 — Линия 1477; 10 — F₁ Азарт; 11 — Линия 19-651; 12 — F₁ Адапт; 13 — Линия 19-609; 14 — F₁ Линия 16-8 × Желтый жемчуг; 15 — Линия 16-8 × Ирма; 16 — Линия 16-8 × Линия 217; 17 — Линия 16-8 × Линия 221

наиболее удобный (четко различимые фрагменты, меньшее время для амплификации), был использован для ДНК-типирования основного исследуемого материала. На рисунках 4 и 5 представлены частичные результаты по выявлению аллелей гена *Ph-3* у образцов для защищенного и открытого грунта.

Амплификация с маркером NCLB-9-6679 выполнялась с использованием Mix 5x Евро-

ген. В результате электрофоретической разгонки продуктов были выявлены ожидаемые фрагменты 1 000 и 1 200 п. н., свидетельствующие о наличии признака устойчивости и восприимчивости к фитофторе, соответственно. На рисунке 6 представлены частичные результаты оценки линейного материала с данным маркером.

В результате апробации представленных

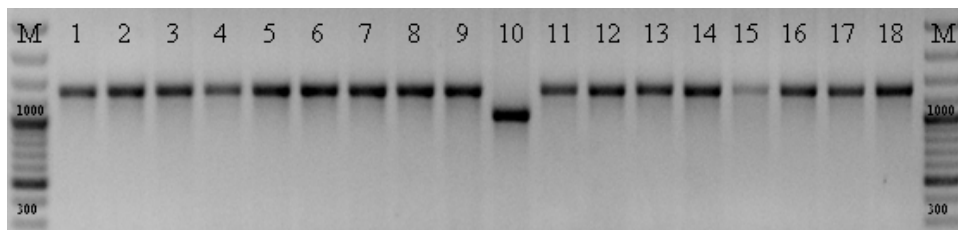


Рис. 6. Продукты амплификации гена *Ph-3* с SCAR маркером NCLB-9-6679: М — маркер молекулярного веса (100 bp); 1, 2 — Линия 19-647; 3, 4 — Линия 19-606; 5, 6 — Линия 19-657; 7, 8 — Линия 19-628; 9, 10 — Линия 1272-4,6; 11, 12 — Штамбовый № 128; 13, 14 — Линия-94; 15, 16 — Линия 19-508; 17, 18 — Линия 19-650

в литературе маркеров, как наиболее эффективные для скрининга образцов нами рекомендованы CAPS dTG63 (*Hinf1*) маркер для выявления аллелей гена *Ph2* и SCAR NCLB-9-6678 маркер для выявления аллелей гена *Ph3* в гомозиготном и гетерозиготном состоянии.

С помощью данных маркеров выявлены источники аллеля устойчивости к фитофторе гена *Ph3* в образцах С9464, ТХ-140, Индиго, используемых в селекции форм для защищенного грунта и гибридах, созданных с их участием: Азарт, Агеньчык, Дзивосны, Блэк Бриллиант. У гибрида-стандарта Аламина выявлен данный ген в гетерозиготном состоянии. Среди образцов для открытого грунта источника-

ми аллеля *Ph3* являются Корнет, Желтый жемчуг, Линия 1476, Линия 1477, гибрид Адапт.

В настоящее время выбранные маркеры используются при создании образцов с комплексом хозяйственно ценных аллелей.

Так созданы 7 линий томатов черри с различным сочетанием аллелей устойчивости: к нематоду (*Mi-1.2*), фузариозу (*I-2*), кладоспориозу (*Cf4*, *Cf9*), фитофторозу (*Ph3*); качества плодов: лежкости плодов (*nor*), накопления проликопина (*t*), ликопина и каротина (*b*); функциональной мужской стерильности (*ps-2* и *Ps-2*) для создания гибридов F₁.

В 2021 году с целью создания форм томата на основе ФМС для открытого и защищен-

ного грунта с сочетанием аллелей *Beta* гена липопин- β -циклазы (СУСВ), обеспечивающего высокий синтез β -каротина и комплексную устойчивость к болезням, отобраны в результате ДНК-типирования по шести хозяйственно ценным аллелям (*B/b*, *hp2^{dg}*, *Sp/sp*, *ps-2/Ps-2*, *Cf5*, *Ph3*) из 123 образцов популяции Т40 F₂ С9464 \times ЛВРН_д (*B//hp2^{dg}*) образцы с гомозиготным сочетанием аллелей *B/hp2^{dg}/sp/ps2/Cf5/Ph3*, *b/hp2^{dg}/sp/ps2/Cf5/Ph3*, *B/hp2^{dg}/sp/Ps2/Cf5/Ph3*, *b/hp2^{dg}/sp/Ps2/Cf5/Ph3*. Данные формы будут использованы в дальнейшем селекционном процессе, направленном на создание форм с высоким качеством плодов и устойчивостью к патогенам.

Заключение

Таким образом, в результате выполненных исследований установлена высокая эффективность выявления гомозиготных и гетерозиготных форм по генам *Ph2* и *Ph3* с помощью CAPS dTG63 (*Hinf1*) и SCAR NCLB-9-6678 маркеров соответственно. Адаптированы методики выделения ДНК, составы реакционных смесей, режимы амплификации и визуализации результатов. Показано наличие аллеля *Ph3* в гибридах F₁-стандартах Адапт и Аламина, в гибридах F₁ Азарт, Агеньчык, Дзівосны, Блэк Бриллиант, внесенных в Реестр сортов Республики Беларусь, а также в селекционных линиях из коллекций Института генетики и цитологии НАН Беларуси и Белорусской государственной сельскохозяйственной академии. При этом, возможно, в ряде форм стандартов или исследуемых форм присутствуют отличные от типизируемых *Ph2* и *Ph3* аллелей иные источники устойчивости.

Список использованных источников

1. Fry W. *Phytophthora infestans*: the plant (and R gene) destroyer / W. Fry – Molecular plant pathology. – 2008. – Vol. 9. – №. 3. – P. 385–402.
2. Potato and tomato late blight caused by *Phytophthora infestans*: an overview of pathology and resistance breeding / Nowicki M. [et al.]. – Plant disease. – 2012. – Vol. 96. – №. 1. – P. 4–17.
3. Epidemiological risk assessment using linked network and grid based modelling: *Phytophthora ramorum* and *Phytophthora kernoviae* in the UK / Harwood T. D. [et al.]. – Ecological Modelling. – 2009. – Vol. 220. – №. 23. – P. 3353–3361.

4. Camilo-Alves C. S. Decline of Mediterranean oak trees and its association with *Phytophthora cinnamomi*: a review / C. S. Camilo-Alves, M. I. Esteves da Clara, N. M. Ribeiro // European Journal of Forest Research. – 2013. – № 132. – P. 411–432.

5. Involvement of *Phytophthora* spp. in chestnut decline in the Black Sea region of Turkey / Akilli S. [et al.]. – Forest Pathology. – 2012. – № 42. – P. 377–386.

6. Поликсенова В. Д. Микозы томата: возбудители заболеваний, устойчивость растений: монография / В. Д. Поликсенова. – Минск: БГУ. – 2008. – 159 с.

7. Response of accessions within tomato wild species, *Solanum pimpinellifolium* to late blight / Foolad M. R. [et al.]. – Plant Breeding. – 2014. – Vol. 133. – №. 3. – P. 401–411.

8. Molecular mapping of the *Ph-3* gene for late blight resistance in tomato / Chunwongse J. [et al.]. – The Journal of Horticultural Science and Biotechnology. – 2002. – Vol. 77. – № 3. – P. 281–286.

9. Late blight resistance in four wild tomato accessions: effectiveness in diverse locations and inheritance of resistance / Black L. L. [et al.]. – Phytopathology. – 1996. – Vol. 86. – №. 11. – P. 24.

10. Genetic mapping of *Ph-2*, a single locus controlling partial resistance to *Phytophthora infestans* in tomato / Moreau P. [et al.]. – Molecular Plant-Microbe Interactions. – 1998. – Vol. 11. – №. 4. – P. 259–269.

11. Gene-based molecular marker system for multiple disease resistances in tomato against Tomato yellow leaf curl virus, late blight, and verticillium wilt / Jung J. [et al.]. – Euphytica. – 2015. – Vol. 205. – №. 2. – P. 599–613.

12. Jia M., Foolad M. R. Genetic analysis of late blight resistance in a new RIL population of tomato derived from LB resistant *Solanum pimpinellifolium* accession PI 270443 / M. Jia, M. R. Foolad. – Plant Breeding. – 2020. – Vol. 139. – № 3. – P. 651–659.

13. Lee J. M. Molecular markers for selecting diverse disease resistances in tomato breeding programs / J. M. Lee, C. S. Oh, I. Yeam. – Plant Breeding and Biotechnology 2015. – Vol. 3. – P. 308–322.

14. Molecular markers associated with *Ph-3* gene conferring late blight resistance in tomato /

Panthee D. R. [et al.]. – American Journal of Plant Sciences. – 2015. – Vol. 6. – №. 13. – P. 2144.

15. Ohlson E. W. Identification and mapping of late blight resistance quantitative trait loci in tomato accession PI 163245 / E. W. Ohlson, H. Ashrafi, M. R. Foolad. – The plant genome. – 2018. – Vol. 11. – №. 3. – doi.org/10.3835/plant-genome2018.01.0007.

16. Molecular mapping of the *Ph-3* gene for late blight resistance in tomato / Chunwongse J. [et al.]. – The Journal of Horticultural Science and Biotechnology. – 2002. – Vol. 77. – №. 3. – P. 281–286.

17. The *Ph-3* gene from *Solanum pimpinellifolium* encodes CC-NBS-LRR protein conferring resistance to *Phytophthora infestans* / Zhang C. [et al.]. – Theor. Appl. Genet. – 2014. – Vol. 127. – P. 1353–1364.

18. Marker-assisted selection for coupling

phase resistance to tomato spotted wilt virus and *Phytophthora infestans* (late blight) in tomato / Robbins M.D. [et al.]. – HortScience. – 2010. – Vol. 45. – P. 1424–1428.

19. Identification and molecular mapping of a new R gene, *Ph-4*, conferring resistance to late blight in tomato / Kole C. [et al.]. – Solanaceae Conference, University of Wisconsin, Madison, Abstract. – 2006. – Vol. 449.

20. Merk H. L. Parent-offspring correlation estimate of heritability for late blight resistance conferred by an accession of the tomato wild species *Solanum pimpinellifolium* / H. L. Merk, M. R. Foolad – Plant Breeding. – 2012. – Vol. 131. – №. 1. – P. 203–210.

21. Panthee D. R. A reexamination of molecular markers for use in marker-assisted breeding in tomato/ Panthee DR, Foolad MR. – Euphytica. – 2012. – Vol. 184, P.165–179.

O. G. Babak¹, E. V. Drozd¹, N. A. Nekrashevich¹, N. V. Anisimova¹, K. K. Yatsevich¹, I. E. Bayeva²,
A. V. Frantsuzionak², I. G. Pugachova², M. M. Dobrodkin², A. V. Kilchevsky¹

ASSESSMENT AND APPLICATION OF MOLECULAR MARKERS IN BREEDING FOR THE RESISTANCE OF TOMATO (*SOLANUM LYCOPERSICUM* L.) TO LATE BLIGHT (*PHYTOPHTHORA INFESTANS*)

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.Babak@igc.by

²Belarusian State Agricultural Academy, 5 Michurin St., 213407 Gorki, Republic of Belarus

In order to use marker-assisted selection (MAS) methods in the development of hybrids and tomato varieties resistant to late blight, the efficiency of molecular markers to the alleles resistant to *Phytophthora infestans* known in the literature was assessed. High efficiency in the identification of homozygous and heterozygous forms using CAPS dTG63 (*Hinf*1) and SCAR NCLB-9-6678 markers to *Ph2* and *Ph3* alleles was established respectively. DNA extraction techniques, reaction mixture compositions, as well as amplification and visualization result modes were adapted. The presence of the *Ph3* allele in F₁-standard Adapt and Alamina hybrids, and F₁ Azart, Agenchik, Dzivosny, and Black Brilliant hybrids included in the Register of Varieties of the Republic of Belarus, as well as in the breeding lines of the collections possessed by the Institute of Genetics and Cytology, NAS of Belarus, and the Belarusian State Agricultural Academy was demonstrated.

Keywords: tomato, late blight resistance, *Phytophthora infestans*, DNA markers.

Дата поступления в редакцию: 27 сентября 2021 г.

С. В. Суховеева, Е. М. Кабачевская, И. Д. Волотовский

О СОПРЯЖЕНИИ ЭКСПРЕССИИ НЕКОТОРЫХ ГЕНОВ ФОСФОЛИПИДНОГО, УГЛЕВОДНОГО МЕТАБОЛИЗМА И ТРАНСМЕМБРАННОГО ТРАНСПОРТА РАСТЕНИЙ ТОМАТА С ИХ РЕАКЦИЕЙ ГРАВИТРОПИЗМА

Государственное научное учреждение
«Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси»
Республика Беларусь, 220072, г. Минск, ул. Академическая, 27
e-mail: suhoveevalmbc@mail.ru

Исследовали влияние гравистимуляции на изменение экспрессии некоторых генов, ассоциированных с фосфолипидным и углеводным метаболизмом, а также с трансмембранным транспортом, в клетках листьев томата на ранних (15 мин–3 ч) и поздних (более 3 ч–24 ч) этапах гравитропического ответа. С использованием ОТ-ПЦР в режиме реального времени показана чувствительность к гравистимуляции экспрессии генов *PLC*, *PLDε*, *EXP*, *β-Gluc*, *α-Gluc*, *H-ATPase*, *Flipp*. Предварительная обработка растений перед началом гравистимуляции этефоном (источником экзогенного этилена) и брассиностероидом эпином приводила к изменению характера экспрессии изученных генов в ответ на гравистимул.

Ключевые слова: томат (*Lycopersicon esculentum* L.), гравитропизм, экспрессия генов, фитогормоны, этилен, брассиностероиды, этефон, эпин.

Введение

Гравитропизм — способность органов высших и низших растений расти в определенном направлении относительно вектора гравитационного поля.

Молекулярные и клеточные основы формирования гравитропического ответа растений до сих пор недостаточно изучены. Большинство работ проведено на примере таких органов растений, как корни и стебель. Реализация гравитропического сигнала в любом органе начинается с восприятия физического гравитационного стимула особыми внутриклеточными структурами, статолитами, в роли которых обычно выступают амилопласты, содержащие два или несколько крупных крахмальных зерна [1]. В случае отклонения органа растения от свойственного ему естественного направления роста относительно вектора гравитации, статолиты, под действием силы тяжести, располагаются в нижней части клетки и оказывают давление на клеточную мембрану, что приводит к ее механическому раздражению и инициации цепи биофизических, биохимических, молекулярных и физиологических изменений, позволяющих растению восстановить свое

первоначальное положение в пространстве. Имеется информация о том, что в гравистимулированном органе растения в течение первых 5 мин гравистимуляции инициируется процесс асимметричного перераспределения в радиальном направлении потоков фитогормона ауксина, в результате чего его содержание, а также концентрация цитоплазматического Ca^{2+} возрастают преимущественно на нижней стороне гравистимулированного органа [2]. Увеличение концентрации Ca^{2+} при передаче различных сигналов в значительной степени определяется действием на кальциевые депо клетки вторичного мессенджера инозитид-3-фосфата, продукта катализа фосфоинозитид-специфической фосфолипазы C (PLC) [3]. Другой продукт катализа PLC, диацилглицерин, превращается в важный вторичный мессенджер фосфатидную кислоту, которая образуется также благодаря каталитической активности разнообразных изоформ фосфолипазы D (PLD) [4]. Фосфатидная кислота и инозитид-3-фосфат могут влиять на активность различных белков, в том числе важного фермента контроля работы транспортеров ауксина, протеинкиназы PINOID, напрямую

связываясь с ее доменами [4].

Происходящие изменения способствуют активации АТФаз [1], в том числе H^+ -АТФазы плазмалеммы, что приводит к быстрому подкислению матрикса клеточной стенки, расщеплению ее полисахаридных структурных элементов, активации процессов роста клеток растяжением. Благодаря этим процессам возникает ассиметричный рост органа растения, приводящий к восстановлению его пространственной ориентации [5]. Гидролиз полисахаридных структурных элементов клеточной стенки при росте клеток растяжением может происходить с участием белков экспансинов [6], альфа-глюкозидаз [7], бета-глюкозидаз [8].

Несмотря на то, что ауксин является ключевым гормональным регулятором гравитропических реакций растений, фитогормональная регуляция роста клеток растяжением может быть опосредована и другими фитогормонами, такими как гиббереллины [9], брассиностероиды (БС) и этилен [10]. Роль гиббереллинов в развитии тропических ростовых реакций надземных органов растений во многом связывают с их способностью усиливать реакцию изгиба, вызываемую ауксином [11]. Биологические эффекты этилена [12] и эпина [13] зачастую двойственные — оба фитогормона могут как активировать, так и ингибировать гравитропизм, они могут выступать как антагонисты ауксина, так что их влияние представляет особый интерес.

Механизмы передачи гравитропического сигнала продолжают активно изучаться, так как имеющаяся информация в основном получена на клеточном и биохимическом уровне. Молекулярно-генетические механизмы гравитропического ответа остаются менее понятными. В том числе практически отсутствуют работы по оценке изменений уровня экспрессии генов при восприятии гравитропического сигнала в клетках таких органов растений как листья.

Целью данного исследования стала оценка уровня экспрессии в клетках листьев растений томата генов фосфоинозитид-зависимой фосфолипазы C (*PLC*) и фосфолипазы Dε (*PLDε*), образующих ключевые сигнальные молекулы растительной клетки [2]. Гены H^+ -АТФазы (*H-ATPase*), флиппазы (*Flipp*), экспансина A5 (*EXP*), бета-глюкозидазы (*β-Gluc*), альфа-

глюкозидазы (*α-Gluc*) были выбраны как гены-кандидаты восприятия клетками листьев растений томата гравитационного сигнала, поскольку кодируемые ими белки могут участвовать в иницировании и собственно метаболизме элементов клеточной стенки, важном для обеспечения роста клеток растяжением. Экспрессию вышеперечисленных генов исследовали на фоне действия различных временных интервалов одиночного гравистимула, гравистимула и синтетического БС эпина, гравистимула и этефона (предшественника этилена) для того, чтобы оценить возможную роль этих фитогормонов в регуляции гравитропического ответа листьев растений.

Материалы и методы

В качестве объекта исследования использовали молодые верхушечные листья 50-дневных растений томата (*Lycopersicon esculentum* L.). Растения выращивали при 16-часовом световом дне (освещение полихроматическим белым светом, 40 Вт, 150 мкмоль $m^{-2}c^{-1}$) при температуре 24 °С. Гравистимуляция проводилась путем поворота растений на 90 °С относительно гравитационного вектора Земли. Растения выдерживались в горизонтальном положении в течение различных промежутков времени (от 15 мин до 24 ч). Для исключения побочного эффекта условий освещенности и возможного развития дополнительной фототропической реакции после поворота растений горизонтально, гравистимуляцию проводили в темноте, предварительно поместив растения контрольных и экспериментальных групп в темноту на 24 ч для адаптации [14]. Часть опытных растений обрабатывалась (до переноса растений в темноту и до гравистимуляции) либо раствором этефона («Sigma», Germany) в концентрации 100 мг/л, либо раствором (200 мкл/л) эпина (производства ИБОХ НАНБ, ОАО «Белреахим») по одному разу в день в течение 8 дней.

Отбор растительной ткани контрольных и экспериментальных групп растений проводился на неактивном для фоторецепторов растений тусклом зеленом свету (лампа накаливания 15 Вт, стеклянный светофильтр с максимумом пропускания 470–605 нм, 0,45 мкмоль $m^{-2}c^{-1}$). Фрагменты листовой ткани (общая масса навески — 50–100 мг) гомогенизи-

ровали в фарфоровой ступке с жидким азотом с помощью фарфорового пестика. Затем из замороженных образцов выделяли общую РНК с использованием «TRI-reagent» («Sigma», Germany) согласно протоколу производителя. Содержание РНК в полученных препаратах оценивали на спектрофотометре «Nanodrop 2000с» (Thermo Scientific) бесцветным способом путем измерения поглощения раствора при 260 нм. О качестве полученных препаратов судили по показателю A260/280, который для чистых образцов обычно составляет 2,0–2,2.

ПЦР проводили в термоциклере «CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System» (Био-Рад, США) с использованием набора

«Luna® Universal qPCR Master Mix» (New England BioLabs Inc., США). Для оценки экспрессии генов *PLC*, *PLDε*, *H-ATPase*, *Flipp*, *EXP*, *β-Gluc*, *α-Gluc* в клетках верхушечных листьев растений томата использовали пары праймеров, представленные в таблице 1. Для поиска нуклеотидных последовательностей исследуемых генов использовалась база данных NCBI GenBank. Конструирование ген-специфических пар праймеров осуществлялось с помощью программы Primer-BLAST NCBI. Синтез праймеров проводили в Институте биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси с использованием ДНК-синтезатора MerMade-4 (BioAutomation Corp., США).

Расчет и анализ полученных данных про-

Таблица 1

Ген-специфические ДНК-праймеры, сконструированные для исследования генов-кандидатов регуляции гравитропического ответа

Название гена	Олигонуклеотидная последовательность ДНК-праймеров
Фосфолипаза C (<i>PLC</i>)	S TGCATATTCTCCACCAGACT, A GGAAGTGTCAATGGGAAGCTC
Фосфолипаза Dε (<i>PLDε</i>)	S GTGATCCCAGTGCAGAAATT, A TGATCATCACAGCTACACCT
H ⁺ -аденозин-трифосфатаза 2 (<i>H-ATPase</i>)	S CACAGAGAACCCTTCATGG, A GACCTTTCAGTGTATGCAAC
Флиппаза (<i>Flipp</i>)	S CGTCTTCTCTGTGTAGCTTG, A CACCCTCATGCACAATATCC
Экспансин A5 (<i>EXP</i>)	S AATTTGTCCACCCATGCTAC, A TTCTGATACTGCACTCCCAT
β-глюкозидаза (<i>β-Gluc</i>)	S GGGATCAGGATACACACAGA, A TTCATCCAAAGAGCAGAACG
α-глюкозидаза (<i>α-Gluc</i>)	S CCAAAGTGTCCCAAAGAA, A GGTAGACGGAAAGAGTGAGA
18S рибосомальная РНК (<i>18S rRNA</i>)	S CGACCCGCGAAGCTCGTTTT, A GGGAGGGCTGTCGATTGTAGTATT

водили с использованием компьютерной программы оценки относительной экспрессии генов REST-MCS (Relative Expression Software Tool, Multiple Condition Solver (version 2)). В качестве гена-нормализатора использовали ген *18S rRNA*.

Представлены результаты экспериментов из 3–6 биологических повторностей. Статистиче-

ски достоверными признавались данные при величине $P < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Оценка уровня относительной экспрессии изучаемых генов в клетках верхушечных листьев томата проводилась в трех вариантах воздействия: гравистимуляция, гравистимуля-

ция и эпин, гравистимуляция и этефон.

Как видно из таблицы 2, при действии гравистимуляции происходило быстрое повышение уровня экспрессии генов фосфолипидной сигнализации (*PLC*, *PLDε*), для которых максимальный уровень экспрессии наблюдался на 15–30 мин воздействия. Для генов трансмембранного транспорта *H-ATPase*, *Flipp* также обнаруживалось увеличение относительного уровня экспрессии, начиная с 15 мин воздействия, при этом максимум достигался через 1 ч, затем наблюдалось ее незначительное снижение. Увеличение экспрессии гена углеводного обмена *α-Gluc* проявлялось уже через 15 мин гравистимуляции, а *β-Gluc* и *EXP* не ранее чем через 30 мин. Высокий уровень экспрессии этой группы генов сохраняется в течение 6 ч воздействия.

При сочетанном воздействии гравистимула и эпина экспрессия изученных генов по критерию транскрипции изменялась в целом в том же направлении, что и при действии одной гравистимуляции, но для ряда исследованных генов сдвигалась на более ранний период (табл. 3). Например, максимальный уровень экспрессии *PLDε* регистрировался через 15 мин, в то время как при гравистимуляции без дополнительных воздействий — через 30 мин. Предварительное воздействие на растения эпина приводит к более сильному увеличению уровня экспрессии генов, ассоциированных с трансмембранным транспортом и углеводным обменом. Особенно сильно (по сравнению с чистой гравистимуляцией) возрастал уровень экспрессии для таких генов, как *α-Gluc* и *Flipp*.

Таблица 2

Уровень относительной экспрессии генов фосфолипидного обмена, трансмембранного транспорта и углеводного обмена в клетках листьев томата при действии гравистимуляции, отн. ед.

Функциональная активность генов и их наименования		Временной интервал воздействия						
		0 мин	15 мин	30 мин	1 ч	3 ч	6 ч	24 ч
Фосфолипидная сигнализация	<i>PLC</i>	1	10,23*	7,2*	6,5*	1,36	3,42	7,3
	<i>PLDε</i>	1	20,25*	30,08*	16,24*	4,11*	3,75	4,76
Трансмембранный транспорт	<i>H-ATPase</i>	1	1,75	2,09*	4,33*	2,9	2,51	3,03
	<i>Flipp</i>	1	2,63*	2,68*	5,2*	2,71	3,22	4,29
Углеводный обмен	<i>EXP</i>	1	0,84	7,11*	9,17*	9,82*	9,51	3,71
	<i>α-Gluc</i>	1	1,48*	11,93*	12,8*	11,97*	18,1	1,22*
	<i>β-Gluc</i>	1	0,97	6,81*	7,44*	9,42*	8,47	0,93

Примечание. * — статистически значимые различия ($P < 0,05$)

Таблица 3

Уровень относительной экспрессии генов фосфолипидного обмена, трансмембранного транспорта и углеводного обмена в клетках листьев томата при действии гравистимуляции и эпина, отн. ед.

Функциональная активность генов и их наименования		Временной интервал воздействия						
		0 мин	15 мин	30 мин	1 ч	3 ч	6 ч	24 ч
Фосфолипидная сигнализация	<i>PLC</i>	1	2,83	5,95*	3,78*	5,34*	3,47*	5,2*
	<i>PLDε</i>	1	14,01*	12,66*	7,92*	8,77*	1,05	4,47
Трансмембранный транспорт	<i>H-ATPase</i>	1	0,56	4,22*	5,49*	4,16*	0,87	12,77*
	<i>Flipp</i>	1	0,64	7,34*	4,12*	2,48*	5,71*	6,23*
Углеводный обмен	<i>EXP</i>	1	0,95*	17,27*	24,56*	22,78*	12,3	1,18*
	<i>α-Gluc</i>	1	1,54*	30,28*	48,21*	39*	8,82*	6,18*
	<i>β-Gluc</i>	1	1	7,14*	8,61*	6,75*	3,82	1,05

Примечание. * — статистически значимые различия ($P < 0,05$)

По итогам экспериментов по действию гравистимуляции и этефона было зарегистрировано изменение уровня экспрессии *PLC*, *PLDε*, *H-ATPase*, *Flipp*, *EXP*, *β-Gluc*, *α-Gluc*, значительно отличающееся от двух предыдущих воздействий (табл. 4). В присутствии этефона повышенный уровень экспрессии *PLC* наблюдался в период воздействия 15 мин–24 ч. Однако для всех остальных генов экспрессия уменьшалась и сохранялась пониженной по сравнению с контролем весь период наблюдения, за исключением 6 ч гравистимуляции, в этот период воздействия наблюдалось некоторое повышение экспрессии *H-ATPase*, *Flipp*.

Интересно, что с течением времени при гравистимуляции наблюдается изменение профилей экспрессии изучаемых генов (рис. 1). При всех трех типах воздействия в первые 15 мин преобладает экспрессия генов фосфолипаз: при гравистимуляции, гравистимуляции

и эпина — *PLC* и *PLDε*, при гравистимуляции и этефоне — только *PLC*. При воздействии гравистимуляции и эпина уже на 30 мин в общем пуле исследованных генов начинает преобладать доля транскриптов генов углеводного обмена *EXP*, *β-Gluc*, *α-Gluc*, в то время как при одиночной гравистимуляции значительное возрастание доли этих генов начинается лишь с 60 мин воздействия. Следует отметить, что при воздействии гравистимуляции и эпина в интервале времени 30–180 мин среди генов углеводного обмена превалирует *α-Gluc*, а при одиночной гравистимуляции доли *α-* и *β-Gluc* примерно одинаковы в этот период. Через 6 ч воздействия гравистимуляции, гравистимуляции и эпина распределение экспрессии генов становится примерно одинаковым, за исключением незначительного преобладания *EXP* в клетках эпин-обработанных растений. После 24 ч воздействия гравистимуляции,

Таблица 4

Уровень относительной экспрессии генов фосфолипидной сигнализации, трансмембранного транспорта и углеводного обмена в клетках листьев томата при действии гравистимуляции и этефона, отн. ед.

Функциональная активность генов и их наименования		Временной интервал воздействия						
		0 мин	15 мин	30 мин	1 ч	3 ч	6 ч	24 ч
Фосфолипидная сигнализация	<i>PLC</i>	1	17,15*	31,23*	28,35*	39,73*	15,78*	3,56
	<i>PLDε</i>	1	0,34*	0,57	0,46	0,44*	1,16	0,26
Трансмембранный транспорт	<i>H-ATPase</i>	1	0,33*	0,49	0,29*	0,57	1,66	0,48*
	<i>Flipp</i>	1	0,58*	0,78	0,39	0,43*	1,63*	0,45*
Углеводный обмен	<i>EXP</i>	1	1	0,3*	0,01*	0,02*	0,09	0,89*
	<i>α-Gluc</i>	1	0,72*	0,17*	0,05*	0,16*	0,22	0,6*
	<i>β-Gluc</i>	1	0,95*	0,18*	0,06*	0,1*	0,15	0,89*

Примечание. * — статистически значимые различия ($P < 0,05$)

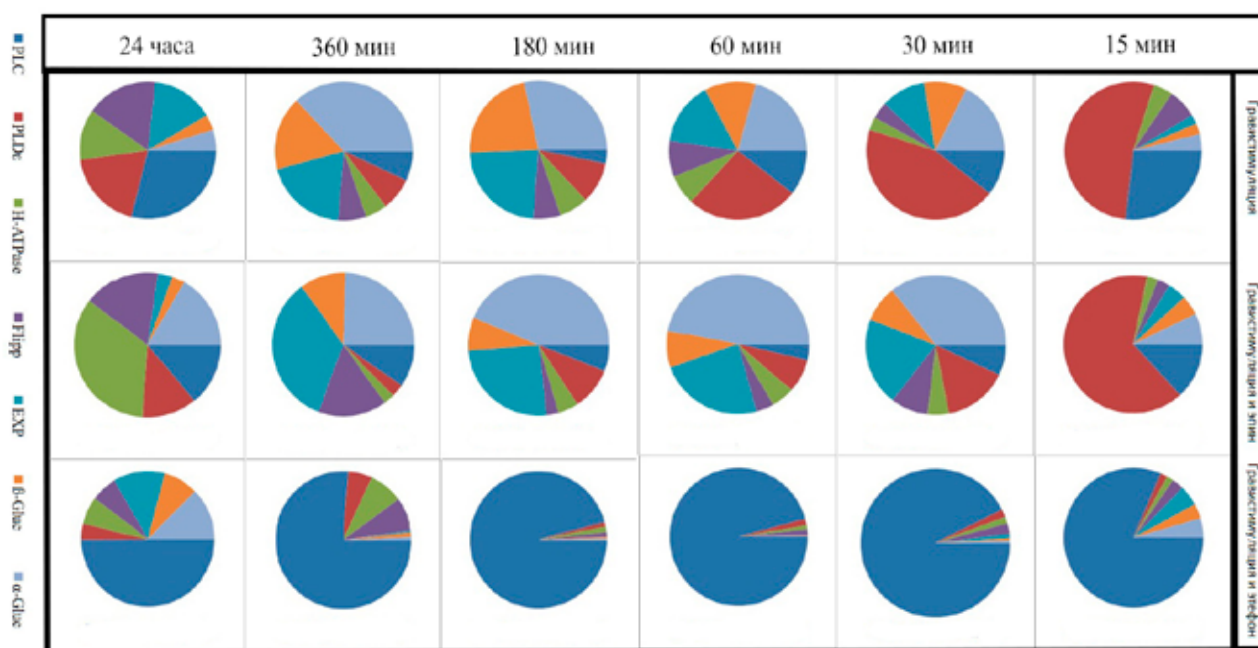


Рис. 1. Профили экспрессии генов фосфолипидной сигнализации, трансмембранного транспорта и углеводного обмена в клетках листьев томата при действии гравистимуляции и фитогормонов

гравистимуляции и эпина обнаруживается снижение доли экспрессии генов углеводного метаболизма, постепенное увеличение доли фосфолипаз. Также в общем пуле возрастает доля экспрессии генов *H-ATPase*, *Flipp*. Воздействие гравистимуляции и этефона через 30–180 мин не приводило к значительным изменениям в распределении экспрессии генов — динамика накопления транскриптов оставалась практически такой же, как и на 15 мин воздействия. Через 6–24 ч воздействия этефона происходит постепенное снижение доли экспрессии в общем пуле *PLC* и увеличение *PLDε*, *H-ATPase*, *Flipp*, *EXP*, β -*Gluc*, α -*Gluc*. Исходя из проведенного анализа по временно-му перераспределению уровней экспрессии генов в пределах 15 мин–24 ч воздействия, можно сделать вывод о том, что на ранних этапах развития гравитропического ответа быстро активируются гены ферментов, участвующих в развитии фосфолипидной сигнализации, далее нарастает роль процессов метаболизма углеводных элементов клеточной стенки, что, видимо, связано с процессами растяжения клетки. Несмотря на то, что уровень экспрессии генов, ассоциированных с трансмембранным транспортом протонов и перемещением фосфолипидов плазмалеммы, также усиливается при действии гравистимуляции, их доля в общем пуле становится заметной только через 24 ч. Наиболее быстрое накопление транскриптов происходит при совместном влиянии гравистимуляции и эпина. При воздействии гравистимуляции и этефона уровень практически всех исследованных генов снижается ниже контрольного.

В ходе проведенных экспериментов выявлено, что гравистимуляция приводит к быстрой и временной активации в клетках листьев томата экспрессии генов, ассоциированных с фосфолипидной сигнализацией, трансмембранным транспортом и углеводным обменом. Экзогенно добавленный БС эпин усиливает действие гравистимуляции на изучаемые гены, в то время как этефон, предшественник этилена, вызывает значительное ингибирование экспрессии практически всех изучаемых генов, за исключением *PLC*, что, вероятно, указывает на важную роль фосфоинозитидного цикла, катализируемого *PLC*, в развитии этиленового ответа.

Эти результаты согласуются с ранее полученными нами данными о скорости формирования угла изгиба стебля томата при трех типах воздействия, из которых следует, что гравистимуляция вызывает наиболее активное формирование изгиба стебля томата в первые 3 ч воздействия, при этом в обработанных эпином растениях изгиб формируется быстрее, чем при действии одной гравистимуляции, а при действии этефона — сильно тормозится и даже через 24 ч растение не возвращается в нормальное положение [15, 16].

Таким образом, гравистимуляция растений путем их поворота на 90° относительно гравитационного вектора Земли приводит к временным изменениям в клетках листьев томата экспрессии различных групп генов, связанных с сигнальными, транспортными и метаболическими процессами в тот же период, когда формируется активный изгиб стебля растения и восстановление его естественного вертикального положения. Гравистимуляция растений в темноте позволила избежать возможного дополнительного воздействия фототропических реакций. Темнота может вызывать в тканях растений разнообразные перестройки, вызванные прекращением фотосинтетического процесса. Используемый в работе общепринятый при исследованиях гравитропизма надземных фотосинтезирующих органов растений прием предварительной адаптации растений к темноте (24 ч) позволил избежать воздействия гравистимула в период формирования наиболее активных первичных реакций растения на затемнение, связанных с циркадным ритмом и ответом метаболизма на отсутствие фотосинтеза. В условиях продолжительного действия темноты (превышающего время периода типичной ночи) происходит поступательный рост активности и экспрессии различных групп гидролаз, необходимых для обеспечения тканей растения питательными веществами, и постепенное старение тканей. Например, в проростках овса в течение нескольких суток постоянного затемнения наблюдается постепенный и необратимый рост экспрессии гена фосфолипазы D [17]. В случае же гравитропического ответа мы наблюдали быстрые и обратимые реакции экспрессии генов, в том числе фосфолипазы D, которые регистрировались сразу после пово-

рота растения горизонтально и возвращались к уровню, близкому к контрольному, в первые 6 ч воздействия. Следует отметить, что через 24 ч после начала гравистимуляции экспрессия ряда генов вновь повышалась по сравнению с нулевым контролем, что, вероятно, уже объясняется влиянием не гравистимула, а затемнения, тем более что в этот период процесс формирования изгиба практически завершен.

В литературе описано участие некоторых из исследуемых нами генов в развитии гравитропического ответа в других органах растений. Так, у мутантных линий мха с целевым нокаутом гена *PLC* [18] значительно снижается способность протонемы к отрицательному гравитропизму во время роста в темноте. Также показано изменение экспрессии гена *PLC* при гравистимуляции в клетках корней арабидопсиса [19]. При гравистимуляции корней *Arabidopsis thaliana* показана передача сигнала с участием гена *PLDzeta2* [20]. Мутанты арабидопсиса по гену *PLDzeta2* и трансгенные растение с нокаутом *PLDzeta2* характеризовались меньшей чувствительностью к ауксину и проявляли пониженную способность к формированию гравитропического изгиба, тогда как трансгенные проростки со сверхэкспрессией гена *PLDzeta2* демонстрировали повышенную способность к гравитропическому ответу. Указанный ответ трансгенных проростков со сверхэкспрессией *PLDzeta2* на гравистимуляцию предположительно связан с тем, что *PLDzeta2* и фосфатидная кислота контролируют везикулярную секрецию, транспортировку и распределение ауксина [21]. Наши исследования показывают, что в формировании ответа на гравистимул в клетках листьев томата участвует ген другой изоформы *PLD*, *PLDε*. Учитывая вышеописанную информацию, а также исследования Lee и др., где показано участие гена фосфолипазы *A2β* в формировании гравитропизма в стеблях арабидопсиса [22], и представлены данные о подавлении гравитропической реакции в корнях, гипокотылях и соцветиях у нокаут-мутантов *Arabidopsis thaliana* по гену фосфолипазы *A-I* [23], можно предположить участие всех трех типов фосфолипаз в формировании гравитропического ответа растений, в том числе листьев.

В публикации журнала *Plant Cell* в 2020

году появились данные о том, что фосфолипид-транспортирующая АТФаза (флиппаза) *ALA3* (aminophospholipid ATPase 3) регулирует полярность транспортеров ауксина — PIN-белков [24]. Нокаут-мутанты арабидопсиса по гену *ALA3* проявляют множество связанных с ауксином пороков развития, в их числе сниженную способность к корневому гравитропизму и нарушение полярного транспорта ауксина за счет снижения способности к везикулярному транспорту PIN-белков. Роль H^+ -АТФазы на биохимическом уровне в ауксин-индуцированном удлинении растительных клеток достаточно хорошо исследована и связана с тем, что этот фермент снижает и активирует рН-чувствительные гидролазы, необходимые для размягчения клеточной стенки и роста клеток растяжением [25]. В наших исследованиях обнаружено участие на молекулярно-генетическом уровне флиппазы (phospholipid-transporting ATPase 6) и H^+ -АТФазы в верхушечных листьях томата при действии гравистимуляции.

К числу ферментов, которые могут участвовать в обеспечении роста клеток растений растяжением, относятся различные глюкозидазы и экспансины. Имеется, например, информация о том, что активность β -глюкозидаз увеличивается в период роста растений, индуцированного ауксинами [26], за счет возрастания растяжимости клеточных стенок растений [27]. Показано увеличение в клеточных стенках экспрессии β -*Gluc* при удлинении клеток в процессе роста базальной части ножки гриба *Coprinopsis cinerea* [8]. Ауксин также вызывает локальное увеличение транскрипции генов экспансинов у делящихся клеток: в апикальной меристеме побега томата, корней риса и при соматическом эмбриогенезе сосны [28]. Б. Р. Кулуев с соавторами (2013) получили трансгенные растения табака со сверхэкспрессией гена *NiEXPA5*, кодирующего α -экспансин в растениях табака, которые характеризовались увеличением размеров листьев и стеблей, при этом величина цветков оставалась практически неизменной. Увеличение размеров органов было обусловлено стимулированием только клеточного растяжения, при этом число клеточных делений даже уменьшалось [29]. Наши исследования показывают, что в клетках листьев томата при действии гравистимуля-

ции увеличивается на уровне транскрипции экспрессия альфа-, бета-глюкозидазы, а также гена экспансина А5.

Заключение

В ходе проведенных исследований показано, что в клетках листьев томата при воздействии гравистимула, гравистимула и эпина, гравистимула и этефона изменяется экспрессия ряда ключевых генов фосфолипидной сигнализации, трансмембранного транспорта, а также метаболизма полисахаридов клеточной стенки.

Следует отметить, что выявленные нами изменения генной экспрессии обнаруживаются не в месте непосредственного гравитропического изгиба, в стебле томата, но в клетках верхушечных листьев растений. Это обстоятельство указывает на то, что к гравистимуляции чувствительны различные ткани и органы растения, что, видимо, позволяет растению быстро и эффективно адаптироваться к изменениям пространственного положения и восстанавливать нормальную ориентацию в пространстве, причем изменения происходят не только на биохимическом или физиологическом уровне, но также на уровне транскрипции генов. Полученные данные свидетельствуют также о том, что гравитропический ответ представляет собой сложный комплекс взаимосвязанных молекулярно-генетических реакций на уровне различных систем организма.

Список использованных источников

1. Molecular Mechanisms of Root Gravitropism / Shih-Heng Su [et al.] // *Current Biology*. – 2017. – Vol. 27, iss. 17. – P. 964–972.
2. Statolith sedimentation kinetics and force transduction to the cortical endoplasmic reticulum in gravity-sensing *Arabidopsis* columella cells / Y. Kolesnikov [et al.] // *Protoplasma*. – 2016. – Vol. 253, iss. 4. – P. 987–1004.
3. Якушкина, Н. И. Физиология растений: учеб. пособие / Н. И. Якушкина; Просвещение. – Москва. – 1980. – 303 с.
4. A role for lipid-mediated signaling in plant gravitropism / С. М. Smith [et al.] // *Botany*. – 2013. – Vol. 100, iss. 1. – P. 153–160.
5. Hager, A. Role of the plasma membrane H⁺-ATPase in auxin-induced elongation growth: historical and new aspects/ A. Hager // *J Plant*

Res. – 2003. – Vol. 416, iss. 6. – P. 483–505.

6. Daniel, J. C. Plant expansins: diversity and interactions with plant cell walls/ J. C. Daniel // *Current opinion in plant biology*. – 2015. – Vol. 25. – P. 162–172.

7. α -Glucosidase I is required for cellulose biosynthesis and morphogenesis in *Arabidopsis* / С. Stewart Gillmor [et al.] // *J Cell Biology*. – 2002. – Vol. 156, iss. 6. – P. 1003–1013.

8. Purification, characterization, and function analysis of an extracellular β -glucosidase from elongating stipe cell walls in *Coprinopsis cinerea*/ W. Zhang [et al.] // *FEMS Microbiology Letters*. – 2016. – Vol. 363, iss. 9. – P. 112.

9. Gibberellin-regulated XET is differentially induced by auxin in rice leaf sheath bases during gravitropic bending / Dayong Cui [et al.] // *Journal of Experimental Botany*. – 2005. – Vol. 56, iss. 415 – P. 1327–1334.

10. Brassinosteroids: Multidimensional Regulators of Plant Growth, Development, and Stress Responses / Trevor M. Nolan [et al.] // *Plant Cell*. – 2020. – Vol. 32, iss. 2. – P. 295–318.

11. Ross, JJ. Auxin, gibberellins and the gravitropic response of grass leaf sheath pulvini / JJ. Ross, C. M. Wolbang // *Plant Signal Behav.* – 2008. – Vol. 3, iss. 1. – P. 74–75.

12. Li, N. The dual-and-opposing-effect of ethylene on the negative gravitropism of *Arabidopsis* inflorescence stem and light-grown hypocotyls / N. Li // *Plant Science*. – 2008. – Vol. 175, iss. 1–2. – P. 71–86.

13. The Role of Brassinosteroids in Shoot Gravitropism / F. Vandenbussche [et al.] // *Plant Physiology*. – 2011. – Vol. 156, iss. 3. – P. 1331–1336.

14. Maxwell, K Chlorophyll fluorescence — a practical guide / K. Maxwell, G. N. Johnson // *Journal of Experimental Botany*. – 2000. – Vol. 51, iss. 345. – P. 659–668.

15. Суховеева, С. В. Влияние биостимулятора эпина на развитие гравитропической реакции верхушечных листьев растений томата / С. В. Суховеева, Е. М. Кабачевская, И. Д. Волоотовский // Сборник материалов V Международной научно-методологической конференции «Роль физиологии и биохимии в интродукции и селекции сельскохозяйственных растений». – Москва. – 15–19 апреля 2019 г. – Т. 2. – С. 88–90

16. Суховеева, С. В. Формирование угла

- изгиба и изменение скорости изгиба стеблей растений томата при гравистимуляции и воздействии экзогенного этилена / С. В. Суховеева, Е. М. Кабачевская, И. Д. Волотовский // Сборник тезисов докладов XIX Всероссийской конференции молодых ученых «Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и сельскохозяйственной микробиологии». – Москва. – 15–16 апреля 2019 г. – Т. 2. – С. 86.
17. Кабачевская, Е. М. Сахарозависимая регуляция активности фосфолипазы D в проростках овса / Е. М. Кабачевская, С. В. Суховеева, И. Д. Волотовский // Доклады НАН Беларуси. – 2019. – Т. 63, № 1. – С. 61–71.
18. Phosphoinositide-specific phospholipase C is involved in cytokinin and gravity responses in the moss *Physcomitrella patens* / A. Repp [et al.] // *The Plant Journal*. – 2004. – Vol. 40, iss. 2. – P. 250–259.
19. Role of inositol 1,4,5-triphosphate signaling in gravitropic and phototropic gene expression / R. Salinas [et al.] // *Plant Cell and Environment*. – 2010. – Vol. 33, iss. 12. – P. 2041–2055.
20. Involvement of *Arabidopsis thaliana* phospholipase D ζ 2 in root hydrotropism through the suppression of root gravitropism / Y. Y. Taniguchi [et al.] // *Planta*. – 2010. – Vol. 231, iss. 2. – P. 491–497.
21. Li, G. *Arabidopsis* PLD ζ 2 regulates vesicle trafficking and is required for auxin response / G. Li, H. Xue // *Plant Cell*. – 2007. – Vol. 1. – P. 281–295.
22. Secretory low molecular weight phospholipase A2 plays important roles in cell elongation and shoot gravitropism in *Arabidopsis* / H. Y. Lee [et al.] // *Plant Cell*. – 2003. – Vol. 15. – P. 1990–2002.
23. Scherer, G. F. E. Gravity-dependent differentiation and root coils in *Arabidopsis thaliana* wild type and phospholipase-AI knockdown mutant grown on the International Space Station / G. F. E. Scherer, P. Pietrzyk // *Plant Biology*. – 2014. – Vol. 16. – P. 97–106.
24. Whitewoods, C. Flipping the Vs: Integrating Vesicle Trafficking, PIN Polarity, and Plant Development / C. Whitewoods // *Plant Cell*. – 2020. – Vol. 32, iss. 5. – P. 1354.
25. Hade, A. Role of the plasma membrane H⁺-ATPase in auxin-induced elongation growth: historical and new aspects / A. Hager // *J. Plant Res.* – 2003. – Vol. 116, iss. 6. – P. 483–505.
26. Shah, M. A. Strategy for purification of aggregation prone β -glucosidases from the cell wall of yeast: a preparative scale approach / M. A. Shah, T. K. Chaudhuri, S. Mishra // *N. Biotechnol.* – 2012. – Vol. 29, iss. 3. – P. 311–320.
27. Hsieh, M. C. Partial purification and characterization of a soybean β -glucosidase with high specific activity towards isoflavone conjugates / M. C. Hsieh, T. L. Graham // *Phytochemistry*. – 2001. – Vol. 58. – P. 995–1005.
28. Головацкая, И. Ф. Морфогенез растений и его регуляция: учеб. пособие / И. Ф. Головацкая; Издательский Дом Томского государственного университета. – Томск, 2016. – 14 с.
29. Головацкая, И. Ф. Морфогенез растений и его регуляция: учеб. пособие / И. Ф. Головацкая; Издательский Дом Томского государственного университета. – Томск, 2016. – 16 с.

S. V. Sukhaveyeva, A. M. Kabachevskaya, I. D. Volotovskii

ON THE COUPLING OF EXPRESSION OF SOME KEY GENES CONTROLLING PHOSPHOLIPID, CARBOHYDRATE METABOLISM AND TRANSMEMBRANE TRANSPORT IN TOMATO PLANTS WITH THEIR GRAVITROPIC REACTION

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: suhoveevalmbc@mail.ru

Effect of gravistimulation on the level of gene expression controlling phospholipid, carbohydrate metabolism and transmembrane transport in tomato leaf cells at early (15 minutes–3 hours) and late (more than 3 hours–24 hours) expositions of gravitropic response was estimated. Sensitivity to gravistimulation of the *PLC*, *PLD ϵ* , *H-ATPase*, *Flipp*, *EXPA5*, β -*Gluc* and α -*Gluc* expression was determined using real-time RT-PCR. The pretreatment of plants with ethephon (the chemical analog of exogenous ethylene) and epibrassinolide (epin) led to a change in the relative level of expression of investigated genes in response to gravistimulation.

Keywords: tomato (*Lycopersicon esculentum* L.), gravitropism, gene expression, phytohormones, ethylene, brassinosteroids, ethephon.

Дата поступления в редакцию: 18 октября 2021 г.

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

КОРРЕЛЯЦИИ И СТРУКТУРА ВАРИАЦИИ ПРИЗНАКОВ КАЧЕСТВА ЗЕРНА И ПРОДУКТИВНОСТИ ЛИНИЙ ПШЕНИЦЫ С ЧУЖЕРОДНЫМ ГЕНЕТИЧЕСКИМ МАТЕРИАЛОМ

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

Исследованы структура вариации и корреляционные связи между признаками качества зерна и продуктивности в выборке, состоящей из сортов *T. aestivum*, родственных видов мягкой пшеницы и полученных на их основе интрогрессивных линий. Усредненные по двум годам эксперимента значения содержания белка, макро- и микроэлементов в зерне сородичей пшеницы выше, чем у сортов (в 1,02–2,13 раза в зависимости от элемента; в 1,4 — для белка). Линии с чужеродным генетическим материалом характеризовались более широким генетическим разнообразием признаков минерального состава, чем родительские формы, и, как правило, превосходили исходные сорта мягкой пшеницы по накоплению микроэлементов. Наибольшее число статистически значимых корреляционных связей (не менее 7) выявлено для N, P, Zn и Fe. Уровень накопления белка ассоциирован с содержанием Mg, P, Fe, Zn, Cu в зерне пшеницы. Масса 1 000 зерен отрицательно коррелирует с рядом признаков минерального состава и содержанием белка в семени, но статистически значимо только с концентрацией азота. Выделены линии, имеющие высокие показатели, как по минеральному составу зерна, так и по продуктивности, которые представляют интерес для селекции пшеницы.

Ключевые слова: виды рода *Triticum*, интрогрессивные линии мягкой пшеницы, содержание белка, макро- и микроэлементов в зерне, корреляции между признаками качества зерна и продуктивности.

Введение

Более 2 млрд людей в мире в той или иной степени страдают от дефицита микроэлементов [1], что негативно сказывается на здоровье. Недостаток железа и цинка может привести к анемии, снижению работоспособности и даже к повышению уровня общей смертности, дефицит марганца — к снижению репродуктивной функции и умственных способностей. В связи с этим большое внимание уделяется улучшению минерального состава сельскохозяйственных культур, играющих ключевую роль в обеспечении населения продовольствием. Пшеница — один из наиболее широко выращиваемых злаков в мире, который обеспечивает около 20% суточной потребности в калориях, а в развивающихся странах данный показатель может достигать 60% [2]. За последние 50 лет произошел существенный рост продуктивности пшеницы, но при этом снизилась питательная ценность зерна. Установлено, что после 1965 года в связи с мас-

совым выращиванием высокопродуктивных и низкорослых сортов, в зерне пшеницы произошло снижение концентрации Fe, Zn, Cu, Mg на 27%, 49%, 39% и 27% соответственно [3]. Существует мнение, что образцы с генами короткостебельности *Rht-B1b* и *Rht-D1b* имеют редуцированную корневую систему, что приводит к снижению способности поглощать минеральные вещества из почвы и запасать их в вегетативных органах [4]. Кроме того, низкое генетическое разнообразие признаков минерального состава зерна не позволяет использовать современные сорта в селекционных программах по улучшению питательной ценности пшеницы [5]. Содержание микроэлементов у стародавних образцов (ландрас) и чужеродных видов выше, чем у культивируемых сортов. Например, уровень накопления Zn у ландрас может достигать 87,29 мг/кг, в то время как у сортов мягкой пшеницы — только 53,30 мг/кг. Для железа данный показатель составляет 122,2 мг/кг и 56,5 мг/кг соответствен-

но [2]. Образцы родственных видов пшеницы (*T. monococcum*, *T. dicoccoides*, *T. dicoccum*, *T. spelta*, *Ae. tauschii*) также характеризуются повышенной концентрацией минералов в зерне по сравнению с сортами *T. aestivum* [6, 7].

Известно, что накопление минералов в зерне пшеницы зависит от многих процессов, включающих их поглощение из почвы, транспорт по корневой системе и стеблю, ремобилизацию из вегетативных органов в зерно [2]. В настоящее время нет точных сведений о физиологических и генетических механизмах данных процессов у пшеницы. Вероятнее всего, для повышения биодоступности микроэлементов из почв пшеница выделяет в ризосферу фитосидерофоры, которые образуют комплексы с ионами минералов для их дальнейшего транспорта в вегетативные части и зерно. Однако есть данные о возможности поглощения и транспорта отдельных микроэлементов (в частности железа) без предварительного формирования комплекса элемента с фитосидерофорами, а напрямую посредством транспортеров семейства ZIP и NRAMP1 [2]. Предполагаемые общие механизмы накопления минералов в зерне пшеницы обуславливают возможность селекции одновременно по нескольким признакам качества зерна. В связи с этим, большой интерес представляют исследования корреляционных отношений между содержанием различных элементов в зерне пшеницы.

С целью обогащения и улучшения генофонда мягкой пшеницы нами получены линии *T. aestivum* с интрогрессиями генетического материала *T. dicoccoides*, *T. dicoccum*, *T. durum*, *T. spelta*, *T. kiharae*, проведен анализ характера чужеродных интрогрессий и их влияния на цитологическую стабильность гибридов [8, 9]. Целью данной работы было изучение возможности улучшения питательной ценности зерна мягкой пшеницы посредством интрогрессии в ее геном генетического материала родственных видов и оценка корреляционных отношений между содержанием основных минеральных элементов, белка и массой 1 000 зерен.

Материалы и методы

В исследование включены 4 сорта яровой мягкой пшеницы (Рассвет, Саратовская 29, Фестивальная, Pitic S62), тетраплоидные

T. dicoccoides, *T. dicoccum* ($2n = 28$) и гексаплоидные *T. spelta*, *T. kiharae* ($2n = 42$) виды рода *Triticum*, а также 20 интрогрессивных линий, полученных нами. Из 20 изученных линий 7 создано с участием *T. dicoccoides* (29 Рассвет \times *T. dicoccoides* к-5199; 8 Саратовская 29 \times *T. dicoccoides*; 11-1, 13-3, 15-7-1, 15-7-2, 16-5 *T. dicoccoides \times Фестивальная), 6 — с *T. kiharae* (19, 20-1, 25-2 *T. kiharae \times Саратовская 29; 28, 34-1, 34-2 *T. kiharae \times Фестивальная) и 5 — с *T. dicoccum* (1-3, 2-7 *T. dicoccum* к-45926 \times Фестивальная, 206-2, 208-3, 213-1 Pitic S62 \times *T. dicoccum* к-45926), 2 — с *T. spelta* (7 *T. spelta* к-1731 \times Саратовская 29, 1-8 *T. spelta* к-1731 \times Рассвет). Образцы чужеродных доноров получены из коллекции ВИР, информация о родословных отдельных образцов не сохранилась (номера по каталогу ВИР не указаны). Растения выращивали на экспериментальных полях Института генетики и цитологии НАН Беларуси в 2018 и 2020 гг. (г. Минск, РБ) на дерново-подзолистой супесчаной почве. Минеральные удобрения вносили в следующих дозах: азотные — 80 кг д. в./га, фосфорные — 70 кг д. в./га, калийные — 90 кг д. в./га.***

Уровень накопления макро- (N, K, P, Ca, Mg) и микроэлементов (Zn, Fe, Cu, Mn) в зерне определяли в Центре аналитических и спектральных измерений Государственного научного учреждения «Институт физики им. Б. И. Степанова НАН Беларуси». Концентрацию азота оценивали на CHNOS-анализаторе VARIO EL фирмы ELEMENTAR, содержание остальных элементов — на атомно-эмиссионном спектрометре IRIS Intrepid II XDL DUO. Для каждого образца анализ проводили в двукратной биологической повторности, измерения повторяли 10 раз для каждой пробы. Общее содержание белка в зерне пшеницы определяли в соответствии с ГОСТ 10846-91 в Центральной республиканской лаборатории ГУ «Государственная инспекция по испытанию и охране сортов растений» (г. Минск, РБ).

Результаты эксперимента обобщены с использованием методов описательной статистики, корреляционного анализа. Статистические процедуры реализованы в программной среде R с использованием библиотек ggplot2 и GGally.

Результаты и обсуждение

Для каждого генотипа данные двухлетнего эксперимента были обобщены в средние значения признаков минерального состава, содержания белка и массы 1 000 зерен, что позволило нивелировать вклад в вариацию генотип-средового взаимодействия, статистическая значимость которого показана в нашей предыдущей работе (находится в печати). Перед проверкой гипотез о взаимосвязи данных признаков проведен расчет мер центральной тенденции в общей выборке, в группе родительских сортов, видов рода *Triticum* и полученных на их основе интрогрессивных линий. Для оценки меж- и внутригрупповых корреляций и структуры вариации признаков использовали: гистограммы, диаграммы распределения, графики рассеяния и диаграммы разброса, описывающие показатели качества зерна в анализируемых группах и общей выборке (рис. 1).

В связи с особенностями формирования выборки (таксономически и генетически различающиеся группы неравного объема) все исследуемые признаки характеризовались отличным от нормального распределением. Чаще встречаются образцы со значениями превосходящими среднее арифметическое по признакам: масса 1 000 зерен, содержание К и Мп. Это выражено в незначительной (К, Мп) или умеренной (масса 1 000 зерен) левосторонней асимметрии ($A_k < 0$) выборочного распределения. В трех экспериментальных группах меры центральной тенденции этих признаков в значительной степени перекрываются (рис. 1). Исходя из анализа кривых распределения и диаграмм размаха, среди линий с чужеродным генетическим материалом присутствуют генотипы, по этим признакам достигающие уровня лучшего родителя. Особенно высокое содержание калия в зерне отмечено для линий 208-3 и 206-2 Pitic S62 × *T. dicosum* к-45926 (6522,8 и 6636,32 мг/кг соответственно), уровень которого превышал значения как родительских форм, так и других интрогрессивных линий.

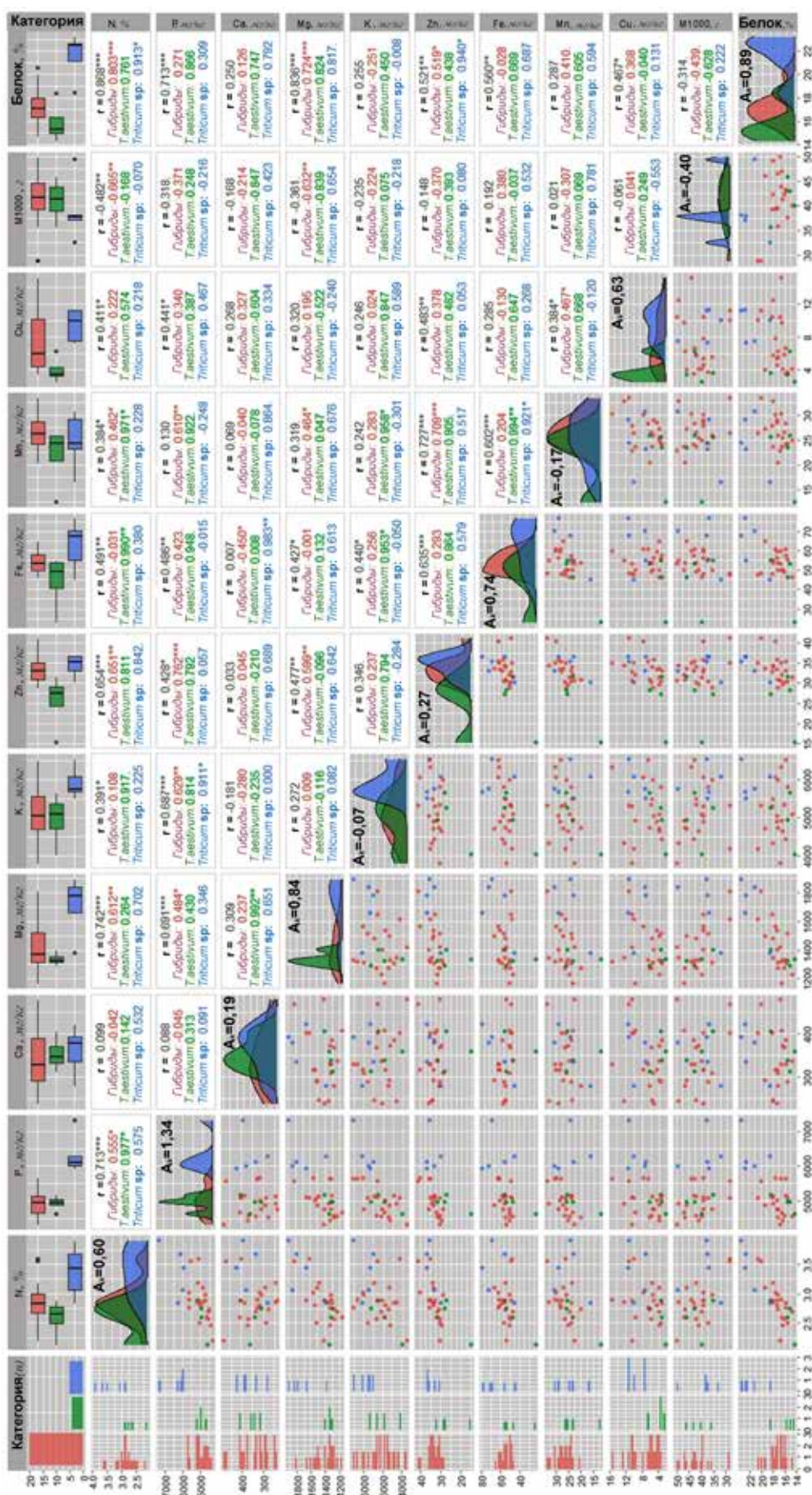
Для признаков с правосторонней асимметрией ($A_k > 0$) существует соотношение Мода < Медиана < Среднее арифметическое. Существенные отклонения от симметрии в сторону низких значений показаны для кон-

центрации в зерне белка, N, Cu, P и Mg. Для содержания Zn и Ca, напротив, отмечена незначительная правосторонняя асимметрия распределения. Выявленные тенденции распределения признаков в выборке отражают особенности накопления минералов, белка и формирования крупного семени у исследуемых сортов, видов и интрогрессивных линий. «Правые хвосты» распределения преимущественно сформированы образцами рода *Triticum* или интрогрессивными линиями с трансгрессией признака.

Усредненные по двум годам эксперимента значения содержания белка, макро- и микроэлементов в зерне сородичей пшеницы выше, чем у сортов (в 1,02–2,13 раза в зависимости от элемента; в 1,4 — для белка). Показанный нами повышенный уровень содержания белка и минералов у видов рода *Triticum* подтверждается данными литературы, согласно которым многие родственные виды *T. aestivum* характеризуются более высоким количеством данных нутриентов в зерне по сравнению с культивируемыми сортами [7, 10]. Достоверных различий между сортами и сородичами пшеницы нами не выявлено только по уровню накопления Ca и Mn. Схожие результаты приводятся в работе Murphy et al., 2008 [11], в которой по содержанию Ca не установлены статистически значимые различия между стародавними и современными сортами пшеницы, а по содержанию Mn различия были минимальны.

Линии с чужеродным генетическим материалом характеризовались более широким генетическим разнообразием признаков минерального состава, чем родительские формы, о чем можно судить по широкому размаху внутригрупповой вариации, мультимодальности построенных гистограмм и низкому эксцессу кривых распределения (рис. 1). Интрогрессивные линии, как правило, превосходили исходные сорта мягкой пшеницы, но уступали видам рода *Triticum* по накоплению белка, Zn, Fe, Cu, Mn. Концентрация N, P, Mg, K у большинства гибридных генотипов была ближе к значениям сорта и уступала показателям сородичей пшеницы (рис. 1).

Из 20 проанализированных линий с интрогрессией чужеродного генетического материала 12 генотипов превышали родительский



A_k — коэффициент асимметрии; r — коэффициент корреляции Пирсона; * — статистически значимо при $p \leq 0,05$; ** — статистически значимо при $p \leq 0,01$
Рис. 1. Категоризованные диаграммы разброса признаков минерального состава зерна, содержания белка и массы 1 000 зерен и коэффициенты корреляции Пирсона между данными признаками для трех групп генотипов пшеницы (сорта, образцы видов *Triticum*, интрогрессивные линии)

сорт по содержанию белка в зерне. Самый высокий процент белка характерен для линий 11-1, 13-3 *T. dicoccoides* × Фестивальная и 19 *T. kiharae* × Саратовская (20,04%; 20,55%; 19,35% соответственно). Следует отметить, что интрогрессивные линии не превосходили по данному показателю лучшую родительскую форму (сородичей пшеницы), что согласуется с данными литературы. Например, в работе Диордиевой и др. [12] показано, что при скрещивании генотипов пшеницы с высоким и низким содержанием белка у гибридов наблюдается наследование данного признака худшего из родителей.

Известно, что масса 1 000 зерен коррелирует с урожайностью и выходом муки. Высокие значения по этому признаку в большей мере свойственны сортам культурной пшеницы, чем родственным видам (рис. 1). Размах вариации массы 1 000 зерен в коллекции интрогрессивных линий составил от 28,8 г (линия 13-3) до 49,95 г (линия 20-1). Как правило, у линий данный показатель был на уровне исходного сорта или с высокой степенью достоверности превышал его. Снижение массы 1 000 зерен по сравнению с исходным сортом выявлено только для 4 линий, созданных с участием *T. dicoccoides* (29, 11-1, 13-3, 8) и 1 — с участием *T. spelta* (1-8). Выделены интрогрессивные линии, превосходящие родительские сорта по содержанию комплекса элементов в оба года: 208-3 и 206-2 *Pitic S62* × *T. dicocum* к-45926 (N, P, K, Zn, Fe, Mn и Cu), 11-1 *T. dicoccoides* × Фестивальная (N, Mg, Zn, Mn, Cu), 16-5 *T. dicoccoides* × Фестивальная (N, P, K, Mg, Zn, Fe, Cu), 15-7-1 *T. dicoccoides* × Фестивальная (N, Mg, Zn, Cu), 19 *T. kiharae* × Саратовская 29 (N, Mg, Fe, Mn), 25-2 *T. kiharae* × Саратовская 29 (N, Mg, Fe, Mn, Cu), 34-1 *T. kiharae* × Фестивальная (Mg, Zn, Fe, Mn, Cu). Данные генотипы также имели высокие значения по массе 1 000 зерен, за исключением линии 11-1 *T. dicoccoides* × Фестивальная, что повышает их ценность для селекции.

Силу и направления связи между признаками крупности зерна (масса 1 000 зерен) и его биохимическим составом (содержания минералов и белка) оценивали с использованием линейного коэффициента корреляции Пирсона (r , рис. 1). Мы не выявили отрицательных корреляций между концентрацией изученных

минеральных элементов в зерне, что позволяет предполагать слабость механизмов конкуренции и антагонизма ионов при транспорте питательных веществ в созревающее семя. Общее количество белка в зерне положительно коррелирует с уровнем накопления N, Mg, P, Fe, Zn и Cu. Масса 1 000 зерен находилась в обратной зависимости от содержания белка и минеральных элементов в семени (исключение — Fe и Mn), однако в общей выборке статистически значима только корреляция массы 1 000 зерен с концентрацией азота, в группе интрогрессивных линий — с N и Mg.

Наибольшее число статистически значимых корреляционных связей выявлено для N, P, Zn и Fe (рис. 1). Тесная ассоциация установлена между содержанием белка и N, Mg, P ($r = 0,87$; $0,84$; $0,71$ соответственно), Zn и Mn ($r = 0,73$), P и Mg ($r = 0,69$), P и K ($r = 0,69$). Общий белок семени коррелирует с содержанием Fe, Zn и Cu ($r = 0,56$; $0,52$; $0,47$ соответственно). Связи средней силы показаны между накоплением Zn и N ($r = 0,65$), Zn и Fe ($r = 0,64$), Fe и Mn ($r = 0,60$), Fe и P ($r = 0,49$), Fe и N ($r = 0,49$), Zn и Cu ($r = 0,48$). Содержание K в зерне коррелирует только с уровнем P, N и Fe. При рассмотрении всех образцов коллекции статистически значимых зависимостей между накоплением Ca и концентрацией других элементов в зерне не выявлено. Однако корреляцию очень высокой силы наблюдали между содержанием Ca и Mg в зерне культурных сортов и между Ca и Fe у диких сородичей пшеницы. Установлено, что сила связи между макроэлементами была выше, чем между макроэлементами и микроэлементами (рис. 1), что предполагает некоторые различия в генетических и физиологических механизмах их накопления в зерне пшеницы.

Основной запасющей тканью зерна злаковых является эндосперм, в центральной части которого накапливается белок (проламины, 11S-глобулины) и крахмал. Однако, 7S-глобулины, масла и более 80% минеральных веществ запасаются во внешнем слое эндосперма (алеироновый слой) и щитке зародыша [13]. Общее содержание белка в зерне исследуемых пшениц статистически достоверно связано с уровнем накопления макро- (N, P, Mg) и микроэлементов (Zn, Fe, Cu). Сопоставимые с нашими результаты были полу-

чены при изучении коллекции дикой полбы, в зерне которой накопление белка коррелировало с содержанием Zn, Fe, Cu, Mg, P [6]. Ассоциация между содержанием белка и Zn, Fe была показана для образцов дикой полбы [14], культурной полбы [15], спельты [7] и для сортов культурной пшеницы [5, 10, 16]. Это указывает на наличие общих физиологических и (или) генетических факторов, контролирующих накопление нутриентов в зерне диких и культурных форм. Так, локусы количественных признаков (QTL), ассоциированные с содержанием белка, Zn, Fe, Cu, P, картированы на 2A, 5A, 6B и 7A хромосомах рекомбинантных линий твердой пшеницы и дикой полбы, а также на 5A хромосоме *T. monosocum* [17]. В настоящее время на коротком плече 6B картирован ген *NAM-B1*, его продукт (транскрипционный фактор) регулирует ремобилизацию питательных веществ из листьев в зерно и оказывает существенное влияние на уровень накопления белка [18]. Кроме того, NAC-фактор регулирует экспрессию некоторых генов, отвечающих за транспорт Zn и Fe из цитоплазмы во флоэму и из флоэмы в зерно [19]. Функциональный аллель *NAM-B1*, связанный с высоким содержанием белка и микроэлементов в зерне, обнаружен преимущественно у сородичей пшеницы, в то время как у современных сортов данный аллель практически не встречается [18]. Результаты оценки стародавних образцов и генотипов различного географического происхождения показали, что потеря функциональных аллелей гена *NAM-B1* произошла в современный период селекции пшеницы и неконтролируемый процесс их утраты продолжается [20]. В нашем исследовании было отмечено увеличение силы связи между общим белком и содержанием N, Zn, Fe и Cu в группе образцов родственных видов (рис. 1). Молекулярно-генетическими методами нами подтверждена утрата функционального аллеля *NAM-B1* в геноме родительских сортов культурной пшеницы и большинства интрогрессивных линий, полученных на их основе (данные не опубликованы). Однако для подтверждения участия гена *NAM-B1* в сдвиге корреляционных взаимоотношений между зерновым белком и минеральными компонентами необходимы дальнейшие исследования.

Показана статистически достоверная связь

азота со всеми изученными минералами, за исключением кальция (рис. 1). Исследования зарубежных ученых установили, что N оказывает положительный эффект на корневое поглощение из почвы микроэлементов, а также на их дальнейший транспорт в побеги и зерно. При высоком уровне азотного питания около 60% Fe из побегов поступает в зерно, а при низком — только 38% [21]. Считается, что азот усиливает активность транспортеров Zn и Fe (ZPT-IRT-подобные белки) и экссудацию фитосидерофоров (никотинамин, аминокислоты), которые играют решающую роль в извлечении микроэлементов из почвы. Напротив, излишнее количество P в почве снижает уровень микоризообразователей и синтез фитосидерофоров, что ингибирует поглощение микроэлементов корнями [22]. Сложные взаимодействия между фосфором, азотом и микроэлементами необходимо учитывать при использовании минеральных удобрений.

Соединения фосфора задействованы в процессах метаболизма, фиксации азота, активации ферментов и рецепторов. Фосфатная группа входит в состав ключевых биомолекул — нуклеиновых кислот, фосфолипидов, аденозинтрифосфорной кислоты. По данным нескольких исследований концентрация фосфора в семени положительно коррелирует с уровнем Zn, Fe, Cu, Ca, K, Mg [6, 17]. Можно отметить, что наиболее высокие коэффициенты корреляции установлены между содержанием в зерне P и K, P и Mg, что согласуется с нашими данными (рис. 1). Тесная связь ($r = 0,71$) выявлена нами также между содержанием P и белка в семени, хотя в группе интрогрессивных линий и диких видов пшеницы уровень достоверности и силы связи между признаками сильно снижен (рис. 1). В работе Peleg et al., 2009 [17] ассоциация между содержанием белка и фосфора составила 0,61, а для четырех из восьми QTL, связанных с уровнем фосфора, показана совместная локализация с QTL, ассоциированных с концентрацией белка. Данный факт необходимо учитывать при селекции на высокую питательную ценность зерна, так как у пшеницы общее содержание белка сильно коррелирует и с содержанием фосфора, и фитиновой кислоты. Известно, что у злаков 85% фосфора депонируется в алейроновом слое в форме фитиновой кислоты, соли

которой хелатируют катионы металлов (Zn^{2+} , Fe^{2+} , Mg^{2+} и др.), тем самым снижая их биодоступность для моногастральных животных и человека [23]. Высвобождение минералов может происходить в результате гидролитического расщепления эфирных связей фитиновой кислоты ферментами фитазами растительного, животного или микробного происхождения, а также при помощи различных технологических приемов в процессе производства кормов. Следует отметить, что при сравнительном анализе минерального состава зерна образцов спельты и мягкой пшеницы установлено, что, несмотря на более высокую концентрацию фосфора в зерне спельты, концентрация фитиновой кислоты у нее была на 40% ниже, чем у *T. aestivum* [24]. На основании этих наблюдений можно предположить, что для спельты характерна более высокая активность эндогенной фитазы или более низкое содержание фитиновой кислоты. Есть данные о высокой активности ферментов гидролиза фитиновой кислоты у генотипов синтетической пшеницы. Таким образом, сородичи пшеницы представляют интерес для увеличения активности фитаз у современных сортов с целью улучшения биодоступности минералов в зерне. Нами получены интрогрессивные линии с низким уровнем корреляции между содержанием белка и фосфора в семени ($r = 0,27$, рис. 1), что имеет значение для питательной ценности зерна пшеницы.

Fe, Cu и Zn — металлы с переменной степенью окисления, в клетке преимущественно представлены двухвалентными катионами. Все эти металлы играют важную роль в клеточном метаболизме, но при высоких концентрациях токсичны. Таким образом, для поддержания ионного гомеостаза растения должны сбалансировать поглощение, утилизацию и запасание этих минералов. Хотя в транспорте каждого из этих металлов участвуют различные молекулы, одни транспортеры могут переносить все три элемента, а другие проявляют специфичность для конкретного иона. Также отличаются стратегии хелатирования и запасания этих минералов. Нами показаны статистически значимые корреляции между уровнем Zn и Fe, Zn и Cu. При этом в группах диких сородичей пшеницы и у интрогрессивных линий данные связи распадаются, что мо-

жет быть обусловлено высоким генетическим разнообразием этих групп. Корреляция между содержанием Fe, Cu, Zn и другими элементами рассмотрена в работах нескольких зарубежных авторов [6, 25]. Особенно большое внимание уделено положительной корреляции Zn, Fe и белка, а также ассоциации между микроэлементами (Zn, Fe, Mn, Cu) [14, 16]. В настоящее время известны общие локусы, ассоциированные с содержанием Zn и Fe в зерне сортов и образцов родственных видов пшеницы на хромосомах 1A, 2A, 2B, 3A, 3D, 4B, 5A, 6A, 6B, 7A, 7B [26]. В работе китайских ученых на основе GWAS идентифицированы 38 генов-кандидатов, связанных с концентрацией Zn, Fe, Mn в зерне пшеницы. Данные гены можно классифицировать на 4 группы, в зависимости от типа белков, которые они кодируют. Так первая группа генов кодирует такие ферменты, как железозависимая диоксигеназа, металлизависимая гидролаза, фосфотаза, метилтрансфераза. Вторая группа — транспортные белки (ABC-транспортер, транспортер тяжелых металлов и сахаров); третья группа — MYB транскрипционные факторы, семейство цинковых пальцев и трансмембранные белки; последняя группа — белки защитного ответа (рецепторподобная киназа, митоген-активированная протеинкиназа (МАРК)) [27].

Корреляции признаков минерального состава зерна с массой 1 000 зерен слабые положительные (Mn, Fe) или слабые отрицательные (P, Ca, Mg, K, Zn, Cu) статистически недостоверные (рис. 1). Масса 1 000 зерен статистически значимо ассоциирована только с концентрацией азота ($r = -0,48$). Наши данные согласуются с результатами, полученными зарубежными авторами, которые также не выявили достоверных связей между массой 1 000 зерен и концентрацией минералов в зерне линий мягкой пшеницы различного происхождения [10, 28]. Изучение 160 линий пшеницы с генетическим материалом *T. dicoccoides* обнаружило статистически значимую положительную связь между массой 1 000 зерен и содержанием в зерне Mn, однако зависимости между массой зерна и концентрациями в нем Zn и Fe были статистически незначимы [27].

Минеральный состав зерна может находиться под сильным влиянием фактора его размера, в связи с чем мы рассмотрели услов-

ные корреляции между признаками содержания девяти элементов и запасного белка при фиксированных значениях массы 1 000 зерен. При фиксации массы семени не отмечено

существенного снижения величины коэффициента корреляции между анализируемыми признаками (рис. 1, рис. 2). Наоборот, в частных корреляциях мы наблюдали увеличение

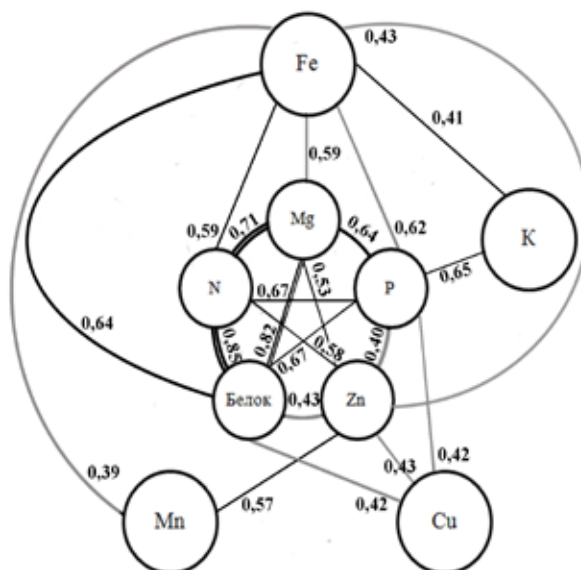


Рис. 2. Граф частных корреляций между признаками содержания белка и девяти элементов в зерне исследуемых интрогрессивных линий пшеницы и их родительских форм

тесноты связи между уровнем Fe и содержанием белка, N, P. При этом частная корреляция железа с содержанием цинка (0,43) и марганца (0,39) в семени несколько слабее парных коэффициентов Пирсона (0,64 и 0,60 соответственно). Выявленные зависимости указывают на отсутствие значимого влияния размера зерна на соотношение концентраций минеральных веществ в семени, что имеет большое значения для организации как селекционного процесса, так и технологии переработки зерна.

Заключение

Биофортификация (биообогащение) зерна минеральными элементами и белком — эффективный и экономичный метод борьбы со скрытым голодом и дефицитом жизненно важных нутриентов в рационе человека. Однако если прогресс в росте продуктивности пшеницы ярко выражен, то успехи в увеличении содержания белка и минералов в зерне незначительны. В первую очередь это связывают с отрицательной корреляцией этих признаков, хотя природа данной зависимости окончательно не ясна. Существует мнение, что низкая концентрация белка и минералов в зерне

современных продуктивных сортов является следствием негативного селекционного отбора на питательную ценность зерна [11]. Мы исследовали структуру вариации, простые линейные связи между признаками качества зерна и массой 1 000 зерен в выборке, состоящей из сортов *T. aestivum*, родственных видов мягкой пшеницы и полученных на их основе интрогрессивных линий.

Усредненные по двум годам эксперимента значения содержания белка, макро- и микроэлементов в зерне сородичей пшеницы были выше, чем у сортов (превышение составило от 1,02 до 2,13 раза в зависимости от элемента; в 1,4 — для белка), что говорит о перспективности использования видов рода *Triticum* в селекционных программах, ориентированных на биофортификацию зерна. Линии с чужеродным генетическим материалом характеризовались более широким генетическим разнообразием признаков минерального состава, чем родительские формы, и, как правило, превосходили исходные сорта мягкой пшеницы по накоплению микроэлементов. Концентрация макроэлементов большинства гибридных генотипов была ближе к значениям сорта. По

содержанию белка в зерне 60% интрогрессивных линий превышали исходный сорт, но не достигали уровня лучшего родителя (сородичей пшеницы).

В нашем исследовании не выявлено отрицательных корреляций между концентрацией изученных минеральных элементов в зерне, что позволяет предполагать слабость механизмов конкуренции и антагонизма ионов при транспорте питательных веществ в созревающее семя. Напротив, статистически значимые связи, установленные между уровнем зернового белка и содержанием Mg, P, Fe, Zn, Cu указывают на возможность улучшения сразу нескольких признаков качества зерна пшеницы. Подтверждением этого являются созданные нами интрогрессивные линии, превосходящие родительские сорта по содержанию комплекса элементов. Отсутствие у изученных генотипов статистически значимых связей между массой 1 000 зерен с накоплением белка и микроэлементов в зерне не позволяет делать однозначных выводов о перспективах селекции на одновременное повышение питательной ценности зерна и продуктивности пшеницы. Однако нами выделены линии, сочетающие высокие показатели по минеральному составу зерна и продуктивности: 208-3 и 206-2 Pitic S62 × *T. dicocum* к45926, 15-7-1 и 16-5 *T. dicoccoides* × Фестивальная, 19 и 25-2 *T. kiharae* × Саратовская 29, 34-1 *T. kiharae* × Фестивальная. Данные линии представляют интерес для селекции пшеницы на качество зерна.

Список использованных источников

1. Tabbita, F. Breeding for increased grain protein and micronutrient content in wheat: ten years of the GPC-B1 gene / F. Tabbita, S. Pearce, A. J. Barneix // *J. Cereal Sci.* – 2017. – Vol. 73. – P. 183–191.
2. Biofortification and bioavailability of Zn, Fe and Se in wheat: present status and future prospects / P. K. Gupta [et al.] // *Theor. Appl. Genet.* – 2021. – Vol. 134, № 1. – P. 1–35.
3. Evidence of decreasing mineral density in wheat grain over the last 160 years / M.-S. Fan [et al.] // *J. Trace Elem. Med. Biol.* – 2008. – Vol. 22. – P. 315–324.
4. Genetic impact of *Rht* dwarfing genes on grain micronutrients concentration in wheat / G. Velu [et al.] // *Field Crops Res.* – 2017. – Vol. 214. – P. 373–377.
5. Iron and zinc grain density in common wheat grown in Central Asia / A. Morgounov [et al.] // *Euphytica.* – 2007. – Vol. 155, № 1–2. – P. 193–203.
6. Genetic diversity for grain nutrients in wild emmer wheat: potential for wheat improvement / M. Chatzav [et al.] // *Annals of Botany.* – 2010. – Vol. 105, № 7. – P. 1211–1220.
7. Grain concentrations of protein and mineral nutrients in a large collection of spelt wheat grown under different environments / H. F. Gomez-Becerra [et al.] // *J. Cereal. Sci.* – 2010. – Vol. 52. – P. 342–349.
8. Features of chromosome behavior in meiosis in common wheat lines containing genetic material of tetraploid wheat species / O. A. Orlovskaya [et al.] // *Russian Journal of Genetics: Applied Research.* – 2016. – Vol. 6, № 2. – P. 225–232.
9. Molecular cytological analysis of alien introgressions in common wheat lines derived from the cross of *Triticum aestivum* with *T. kiharae* / O. A. Orlovskaya [et al.] // *BMC Plant Biology.* – 2020. – Vol. 20 (Suppl. 1). – Pub. 201.
10. Variation in mineral micronutrient concentrations in grain of wheat lines of diverse origin / F. J. Zhao [et al.] // *J. Cereal. Sci.* – 2009. – Vol. 49, № 2. – P. 290–295.
11. Murphy, K. M. Relationship between yield and mineral nutrient concentrations in historical and modern spring wheat cultivars / K. M. Murphy, P. G. Reeves, S. S. Jones // *Euphytica.* – 2008. – Vol. 163, № 3. – P. 381–390.
12. О результатах селекции пшеницы спельта (*Triticum spelta* L.) на продуктивность и качество зерна / И. П. Диордиева и др. // *Сельскохозяйственная биология.* – 2020. – Т. 55, № 3. – С. 552–563.
13. Spatial X-ray fluorescence micro-imaging of minerals in grain tissues of wheat and related genotypes / S. P. Singh [et al.] // *Planta.* – 2014. – Vol. 240, № 2. – P. 277–89.
14. Grain zinc, iron and protein concentrations and zinc-efficiency in wild emmer wheat under contrasting irrigation regimes / Z. Peleg [et al.] // *Plant Soil.* – 2008. – Vol. 306. – P. 57–67.
15. Gregorio, G. B. Progress in breeding for trace minerals in staple crops / G. B. Gregorio // *J. Nutr.* – 2002. – Vol. 132, № 3. – P. 500–502.

16. Genetic variability and stability of grain magnesium, zinc and iron concentration in bread wheat / F. X. Oury [et al.] // *Eur. J. Agron.* – 2006. – Vol. 25, № 2. – P. 177–185.
17. Quantitative trait loci conferring grain mineral nutrient concentrations in durum wheat x wild emmer wheat RIL population / Z. Peleg [et al.] // *Theor. Appl. Genet.* – 2009. – Vol. 119, № 2. – P. 353–369.
18. A NAC gene regulating senescence improves grain protein, zink, and iron content in wheat / C. Uauy [et al.] // *Science.* – 2006. – Vol. 314, № 5803. – P. 1298–1301.
19. Regulation of Zn and Fe transporters by the *GPC1* gene during early wheat monocarpic senescence / S. Pearce [et al.] // *BMC Plant Biol.* – 2014. – Vol. 14. – Pub. 368.
20. Asplund, L. Re-evaluating the history of the wheat domestication gene *NAM-B1* using historical plant material / L. Asplund, J. Hagenblad, M. W. Leino // *J. Archaeol. Sci.* – 2010. – Vol. 37, № 9. – P. 2303–2307.
21. Kutman, U. B. Effect of nitrogen on uptake, remobilization, and partitioning of zinc and iron throughout the development of durum wheat // U. B. Kutman, B. Yildiz, I. Cakmak // *Plant and Soil.* – 2011. – Vol. 342. – P. 149–164.
22. The reduction in zinc concentration of wheat grain upon increased phosphorus-fertilization and its mitigation by foliar zinc application / Y. Q. Zhang [et al.] // *Plant and Soil.* – 2012. – Vol. 361. – P. 143–152.
23. Determination of phytic acid in cereals—a brief review / P. Wu [et al.] // *Int. J. Food Sci. Technol.* – 2009. – Vol. 44, № 9. – P. 1671–1676.
24. Spelt (*Triticum aestivum* ssp. spelta) as a source of breadmaking flours and bran naturally enriched in oleic acid and minerals but not phytic acid / N. L. Ruibal-Mendieta [et al.] // *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* – 2005. – Vol. 53, № 7. – P. 2751–2759.
25. Variation in grain Zn concentration, and the grain ionome, in field-grown Indian wheat / J. S. Khokhar [et al.] // *PLoS One.* – 2018. – Vol. 13, № 1. – e0192026.
26. QTL mapping of grain Zn and Fe concentrations in two hexaploid wheat RIL populations with ample transgressive segregation / L. A. Crespo-Herrera [et al.] // *Front. Plant Sci.* – 2017. – Vol. 8. – Pub. 1800.
27. Genome-wide association study for grain micronutrient concentrations in wheat advanced lines derived from wild emmer / J. Liu [et al.] // *Front. Plant Sci.* – 2021. – Vol. 12. – Pub. 651283.
28. Genetic gain for grain micronutrients and their association with phenology in historical wheat cultivars released between 1911 and 2016 in Pakistan / M. Shaukat [et al.] // *Agronomy.* – 2021. – Vol. 11, № 6. – Pub. 1247.

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

CORRELATIONS AND VARIATION STRUCTURE OF GRAIN QUALITY TRAITS AND YIELD OF WHEAT LINES WITH FOREIGN GENETIC MATERIAL

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: O.Orlovskaya@igc.by

We studied variation structure and correlations between the traits of grain quality and yield in the sample consisting of *T. aestivum* cultivars, related common wheat species and introgression lines obtained on their basis. In the grain of wheat relatives, two-year average grain macronutrients, micronutrients and protein content were higher than in *T. aestivum* (1.02 to 2.13 times, depending on the element; 1.4 — for protein). The genetic diversity of mineral composition traits was wider for the lines containing foreign genetic material than for their parental forms, and as a rule, the introgression lines exceeded the original common wheat varieties in the microelements accumulation. The greatest possible number of statistically significant correlations (at least 7) was found for N, P, Zn and Fe content. Protein content was associated with grain's Mg, P, Fe, Zn, Cu. Thousand-kernel weight (TKW) is was negatively correlated with some traits of mineral composition and seed protein content. But the only significant ($p = 0.05$) association was between TKW and seed nitrogen. We identified lines with optimal mineral composition and high grain productivity, which are of interest for wheat breeding programs.

Keywords: species of genus *Triticum*, introgression lines of common wheat, grain protein, macro- and micronutrients content, correlations between traits of grain quality and yield.

Дата поступления в редакцию: 10 сентября 2021 г.

К. Ю. Песоцкая, А. Л. Лагоненко, А. Н. Евтушенков

ИЗУЧЕНИЕ РОЛИ ТРАНСКРИПЦИОННОГО РЕГУЛЯТОРА *MAR*R В ВИРУЛЕНТНОСТИ ФИТОПАТОГЕННЫХ БАКТЕРИЙ *ERWINIA AMYLOVORA*

Белорусский государственный университет
Республика Беларусь, 220030, г. Минск, пр-т Независимости, 4
e-mail: karina345678@mail.ru

В данном исследовании нами было показано, что мутация в гене транскрипционного регулятора *MarR* *E. amylovora* имеет плейотропный эффект. Бактерии *E. amylovora* $\Delta marR$ характеризуются сниженной вирулентностью по отношению к вегетирующим растениям груши, сниженной продукцией экзополисахарида левана и подвижностью. Кроме того, показано, что клетки мутанта синтезируют большее количество целлюлозы по сравнению с клетками бактерий дикого типа. Таким образом, *MarR* является важным регулятором транскрипции, участвующим в регуляции синтеза большой группы факторов, связанных с вирулентностью *E. amylovora*.

Ключевые слова: *Erwinia amylovora*, транскрипционный регулятор, бактериальный ожог, факторы вирулентности, делеционный мутант.

Введение

Бактериальные болезни растений, в частности бактериозы овощных, технических и плодовых культур ведут к значительным потерям урожая, что наносит огромный ущерб мировой экономике. Бактериальный ожог яблони и груши, возбудителем которого является *Erwinia amylovora*, вызывает не только потери сельскохозяйственной продукции, но и гибель плодовых деревьев. Так, в США ежегодные убытки от распространения данного заболевания оцениваются в более 100 млн долларов [1]. В настоящий момент бактериальный ожог обнаружен в 40 странах мира, в том числе и Республике Беларусь [2].

Основные факторы вирулентности бактерий *E. amylovora* (сидерофор десферриоксамин, эффекторы системы секреции третьего типа, экзополисахариды амиловоран и леван) изучены достаточно хорошо, однако механизм регуляции их экспрессии до конца не определен [3, 4].

Белки семейства *MarR* (*Multiple Antibiotic Resistance*) составляют группу транскрипционных регуляторов, изменяющих экспрессию генов, отвечающих за вирулентность, стрессовые реакции, формирование биопленок и выведение из бактериальной клетки широкого спектра токсичных веществ: антибиотиков,

фенольных соединений, активных форм кислорода, а также бытовых моющих и дезинфицирующих средств [5, 6, 7, 8, 9]. Принцип действия белков семейства *MarR* основан на детекции изменений условий окружающей среды (связывание с лигандами или окисление специфических цистеиновых остатков) и последующей активации или репрессии транскрипции подконтрольных генов [11]. Типовым представителем семейства является белок *MarR* *Escherichia coli* — негативный регулятор транскрипции *marRAB*-оперона [7, 10]. В отсутствие индукторов (слабых органических кислот, фенольных соединений, таких как салициловая кислота, плюмбагин, 2,3-дигидроксибензоат) белок *MarR* связывается с ДНК в промоторной области *marRAB*-оперона, таким образом препятствуя началу транскрипции. В том случае, если лиганд присутствует в клетке, он связывает молекулу *MarR*, что приводит к ослаблению его связывания с ДНК и активации транскрипции путем связывания белка *MarA* с промоторной областью *marRAB*-оперона [10, 12]. У бактерий *Erwinia amylovora* функциональная роль белков семейства *MarR* остается невыясненной.

Целью настоящего исследования явилась физиолого-биохимическая, молекулярно-биологическая, а также фитопатологическая

характеристика штамма *Erwinia amylovora*, мутантного по гену транскрипционного регулятора MarR.

Материалы и методы

Использованные в работе штаммы бактерий, плазмиды и праймеры приведены в таблицах 1 и 2. Бактерии выращивались при 28 °С в полноценной питательной среде LB и синтетической минимальной среде M9 с добавлением глюкозы (2 г/л) в качестве источника углерода. Состав среды LB (г/л): пептон — 10; дрожжевой экстракт — 5; NaCl — 8,5. Состав среды M9 (г/л): Na₂HPO₄ × 7H₂O — 12,8; KH₂PO₄ — 3; NH₄Cl — 1,0; NaCl — 0,5; MgSO₄ × 7H₂O — 0,246; CaCl₂ — 0,011 [13].

Поиск генов, кодирующих регуляторы семейства MarR в геноме *E. amylovora* E2 (код

доступа в GenBank NZ_CP024970.1) осуществляли с помощью программы Sigmoid [15]. Поиск гомологичных последовательностей в базах данных осуществляли с использованием пакета программ BLAST [16].

Для получения делеционного мутанта *E. amylovora* по гену *marR* была использована техника «PCR-based one-step inactivation of chromosomal genes» (Datsenko and Wanner, 2000).

ПЦР проводили в объеме 20 мкл. Состав смеси: 10 пмоль каждого праймера; 0,2 ед. Taq ДНК-полимеразы; по 0,2 мМ дАТФ, дГТФ, дЦТФ и дТТФ; 16 мМ сульфата аммония; 10 мМ Tris-HCl (pH 8,3); 1,5 мМ MgCl₂; 50 мМ KCl; 10 нг ДНК (либо 1 мкл суспензии клеток *Erwinia amylovora* в дистиллированной воде). Параметры амплификации с праймера-

Таблица 1

Использованные в работе штаммы бактерий и плазмиды

Штаммы, плазмиды	Характеристика	Источник или ссылка
Штаммы <i>Erwinia amylovora</i>		
<i>E. amylovora</i> E2	Штамм дикого типа, выделен из <i>Malus</i> sp. в Беларуси в 2007 году	Коллекция кафедры молекулярной биологии
<i>E. amylovora</i> Δ <i>marR</i>	Δ <i>marR</i> мутант, Km ^R	Это исследование
Плазмиды		
pKD46	Ap ^R , P _{BAD} gam bet exo pSC101 oriTS	[14]
pKD13	Km ^R , FRT cat FRT PS1 PS2 oriR6K rgbN	[14]

Примечание. Km^R, Ap^R — устойчивость к канамицину и ампициллину соответственно

Таблица 2

Использованные в работе праймеры

Название праймера	Последовательность (5'-3')	Назначение/ссылка
MarRF	tggtgaacttagatagaccataataatcaggcatcacataatttgaac GCGATTGTGTAGGCTGGAGCT	Внесение делеции в ген <i>marR</i>
MarRR	cacgtgcgcataagggtttgtgctaccgacacgttatctgccc ATCCGGGGATCCGTCCGACC	Внесение делеции в ген <i>marR</i>
MarPRF	CCGCTCGAGtctaccctcatggcatagggtag	Детекция делеции гена <i>marR</i>
Km2	CGGTGCCCTGAATGAACTGC	Детекция делеции гена <i>marR</i> [14]

ми MarRF/MarRR: 1 цикл: 94 °C — 5 мин; 30 циклов: 94 °C — 30 с, 55 °C — 30 с, 72 °C — 90 с; 1 цикл: 72 °C — 5 мин.

Параметры амплификации с праймерами MarPRF/Km2: 1 цикл: 94 °C — 5 мин; 30 циклов: 94 °C — 30 с, 58 °C — 30 с, 72 °C — 60 с; 1 цикл: 72 °C — 5 мин. В работе был использован амплификатор SureCycler 8800 Thermal Cycler («Agilent Technologies», США). Продукты амплификации разделяли электрофорезом в 0,8–1% агарозном геле.

Для искусственного заражения бактериями *Erwinia amylovora* использовали однолетние растения груши, выращенные *ex vivo* на базе отдела биотехнологии РУП «Институт плодородства НАН Беларуси». У каждого растения самый молодой лист разрезали поперек (должна быть затронута центральная жилка) ножницами, предварительно погруженными в суспензию клеток *E. amylovora* ($OD_{600} = 0,1$) [17]. Инокулированные растения инкубировали при 25 °C, относительной влажности 70%, 16-и часовом световом фотопериоде. Учет результатов проводился на 8-ые, 11-ые, 14-ые и 19-ые сутки с момента заражения. Интенсивность развития болезни выражали в % пораженной некрозом части побега от его общей длины.

Количество бактерий в растительном материале определяли по стандартной методике. Растительная ткань (80 мг) гомогенизировалась в 1 мл физиологического раствора. Высев бактерий осуществляли на поверхность 1,5% полноценной агаризованной среды [18, 19].

Количественная оценка интенсивности формирования биопленок проводилась методом, описанным в работе [20], с некоторыми модификациями. Ночная культура *E. amylovora* разводилась средой инкубации (полноценной средой LB и минимальной средой M9) до оптической плотности 0,05. Полученные суспензии вносились в лунки стерильного 96-луночного планшета и инкубировались при 28 °C в течение 48 и 72 ч. Для окрашивания клеток биопленки использовался 1%-ный раствор генцианового фиолетового. Для экстракции связавшегося красителя лунки планшета заполнялись 96% этанолом, после чего измерялась оптическая плотность при длине волны 595 нм. Полученные значения пересчитывались на значения оптической плотности культуры для каждой из лунок соответственно.

Уровень синтеза экзополисахарида амиловорана определялся путем измерения мутности опытного раствора при взаимодействии хлорид-ионов цетилпиридиума с карбоксильной группой глюкуроновых кислот в структуре амиловорана, что вызывает его преципитацию. Для этого суспензия бактериальных клеток осаждалась центрифугированием при 10 000 g, после чего к супенатанту добавлялся раствор хлорид цетилпиридиниума в концентрации 50 мг/мл. Оптическая плотность раствора измерялась при длине волны 600 нм [17].

Продукция экзополисахарида левана клетками *E. amylovora* оценивалась по активности фермента левансукразы, отвечающего за синтез полисахарида. После осаждения бактериальных клеток к надосадочной жидкости добавлялся LS-буфер (50 мМ К-фосфатный буфер, pH 7,0; 2 М сахараза; 0,05% NaN_3) в соотношении 1:1. После инкубации при 28 °C в течение 24 ч измерялась оптическая плотность раствора при 600 нм [21].

Изучение продукции целлюлозы клетками дикого типа и мутантных штаммов *E. amylovora* осуществлялось с использованием красителей Конго красный и Кумасси бриллиантовый синий G-250. Ночные культуры исследуемых штаммов наносились на поверхность агаризованной среды (1,5%-ный LB-агар без добавления NaCl), содержащей красители в соответствующей концентрации. Учет результатов проводился визуально после инкубации в течение 24 ч при 28 °C [22].

Подвижность клеток *E. amylovora* изучалась с использованием полноценной и минимальной (M9) полужидких агаризованных сред. Суспензия бактериальных клеток в объеме 10 мкл наносилась на поверхность необходимой агаризованной среды. Диаметр макроколонии бактерий учитывался через 24, 48 и 72 ч инкубации при 28 °C на полноценной среде LB, через 48, 72 и 96 ч инкубации при 28 °C на минимальной среде M9 [23].

Статистическая обработка результатов проводилась в программе GraphPad Prism 8. Для проверки отклонения распределения от нормального применяли обладающий наибольшей мощностью тест Шапиро-Уилка. При выявлении нормального распределения для оценки достоверности различий был применен t-критерий Стьюдента для независимых выбо-

рок в модификации Уэлча (сравнение средних без какого-либо предположения о равенстве дисперсий). При выявлении распределения, отличного от нормального, для оценки достоверности различий был применен U-критерий Манна-Уитни. Различия считались значимыми при уровне $P < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

Транскрипционные факторы семейства MarR широко распространены у бактерий и архей. Предыдущие исследования показали, что представители семейства регулируют вирулентность многих патогенных бактерий животных и растений. Например, SlyA *Salmonella enterica*, Rv1404 *Mycobacterium tuberculosis*, PecS *Dickeya dadantii*, SarZ *Staphylococcus aureus* и др [6, 9, 11]. Геном *Erwinia amylovora* кодирует несколько транскрипционных факторов семейства MarR, но ни один из них не был охарактеризован экспериментально.

Анализ генома *Erwinia amylovora* E2 позволил выявить четыре гена, кодирующие регуляторы MarR-семейства: *marR* (координаты в геноме 1,533,551..1,533,982 п. н.), *mprA* (2,834,616..2,835,146 п. н.), *ohrR* (3,717,873..3,718,340 п. н.) и *slyA* (1,802,653..1,803,090 п. н.). Ген *marR* кодирует белок, состоящий из 143 а. о., массой 16,23 кДа. MarR *Erwinia amylovora* E2 на 94% идентичен белку MarR *Erwinia tasmaniensis* Et1/99 (CAO97117.1) и на 62% *Pantoea agglomerans* (WP_061062124.1). MarR кодируется первым геном *marRAB*-оперона с очень интересной организацией. Следующие два гена являются паралогами *emrB* (кодирует MFS транспортер) и *emrA* (кодирует membrane fusion protein) соответственно, что делает оперон похожим по организации на *emrRAB*. Однако в состав данного оперона входит еще один ген, кодирующий гомолог TolC (формирует канал во внешней мембране). Вероятнее всего, продукты этого оперона вовлечены в формирование помпы множественной лекарственной устойчивости.

Для инактивации гена *marR* были сконструированы праймеры для амплификации гена устойчивости к канамицину в составе плазмиды rKD13, несущие на 5'-конце последовательности (50 н.) соответствующие нача-

лу или концу делегируемой области генома *Erwinia amylovora*. Полученные с помощью таких праймеров ПЦР-продукты были трансформированы в клетки *Erwinia amylovora* E2, несущие хелперную плазмиду rKD46 и выращенные в условиях индукции рекомбиназы. В результате проделанной работы был отобран штамм устойчивый к канамицину. Наличие делеции гена *marR* было подтверждено ПЦР с праймерами к областям, фланкирующим делецию, а также с внутренними праймерами к гену устойчивости к канамицину.

В ряде работ по изучению роли белков семейства MarR было продемонстрировано, что инактивация данных регуляторов вызывает значительное снижение вирулентности у патогенных штаммов [9, 24, 25, 26, 27]. В связи с этим, на первом этапе исследования была проведена оценка вирулентности делеционного мутанта *E. amylovora*. Полученные результаты отображены на рисунке 1.

Из представленных данных видно, что клетки *E. amylovora* $\Delta marR$ обладали сниженной вирулентностью при искусственном заражении растений груши, при этом численность клеток штамма дикого типа и мутантного штамма *Erwinia amylovora* оставалась сравнительно одинаковой — $1,85 \times 10^7$ КОЕ/мл и $1,89 \times 10^7$ КОЕ/мл соответственно. Данный факт может свидетельствовать о том, что снижение вирулентных свойств у штамма *E. amylovora* $\Delta marR$ связано с нарушением экспрессии генов, кодирующих синтез важных факторов патогенности.

На следующем этапе работы нами был изучен уровень продукции экзополисахаридов амиловорана, левана и целлюлозы у *E. amylovora* $\Delta marR$. В результате было выявлено снижение количества левана, продуцируемого клетками мутантного штамма, а также увеличение синтеза целлюлозы. Количество амиловорана не отличалось от контрольных значений (рис. 2).

Известно, что индукция многих факторов вирулентности происходит при выращивании фитопатогенных бактерий в минимальных питательных средах — условиях, имитирующих среду апопласта растительной ткани. Поэтому в следующих экспериментах мы использовали как полноценную (LB), так и минимальную питательные среды.

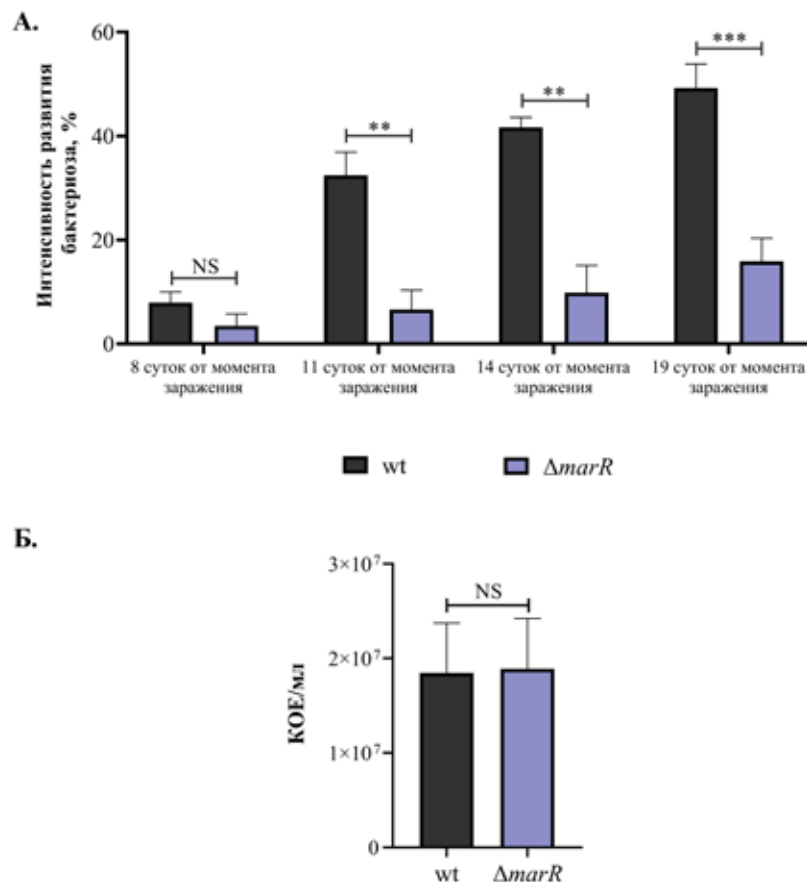


Рис. 1. Влияние делеции гена *marR* на вирулентность клеток *Erwinia amylovora*

- (А) Интенсивность развития бактериального ожога на молодых растениях груши (*Pirus* sp.) при заражении клетками *E. amylovora* E2 и *E. amylovora* $\Delta marR$ (U-критерий Манна-Уитни);
 (Б) Численность жизнеспособных клеток *E. amylovora* в растительной ткани на 19 сутки с момента заражения (t-критерий Стьюдента в модификации Уэлча). NS — нет достоверных различий; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$

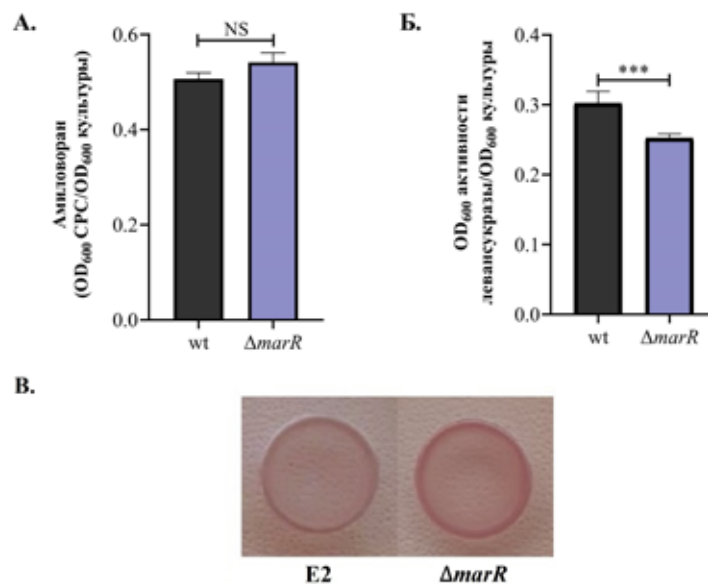


Рис. 2. Продукция экзополисахаридов клетками штаммов *E. amylovora* E2 (wt) и $\Delta marR$

- (А) Продукция амиловорана (t-критерий Стьюдента в модификации Уэлча);
 (Б) Активность левансуказы (t-критерий Стьюдента в модификации Уэлча). NS — нет достоверных различий; *** $P < 0,001$; (В) Качественное определение продукции целлюлозы

Развитие многих бактериальных инфекций, в том числе бактериозов растений, связано с формированием биопленок — сообществ микроорганизмов, клетки которых прикреплены к различной биотической и абиотической поверхности и погружены в биополимерный матрикс [4]. Образование биопленок микроорганизмами служит универсальным фактором защиты от внешних воздействий. Бактерий, находящихся в составе самой биопленки, называют sessильными или оседлыми. При дисперсии оседлых форм бактерий из биопленки, они переходят к планктонному образу жизни. В последующем при фиксации на биотическом или абиотическом субстрате планктонные бактерии способны образовывать биоплен-

ки — то есть переходить в оседлую форму [28, 29]. У *E. amylovora*, наряду с продукцией экзополисахаридов и системой секреции третьего типа, одним из факторов вирулентности также является формирование клетками биопленок. Проведенные нами эксперименты по определению интенсивности формирования биопленок в полноценной и минимальной средах культивирования не выявили достоверных отличий между клетками штамма дикого типа и делеционного мутанта (рис. 3).

В исследовании M. J. Ferrándiz et al. было показано, что транскрипционный регулятор *HosA*, принадлежащий к семейству *MarR*, положительно регулирует экспрессию генов, продукты которых вовлечены в подвижность

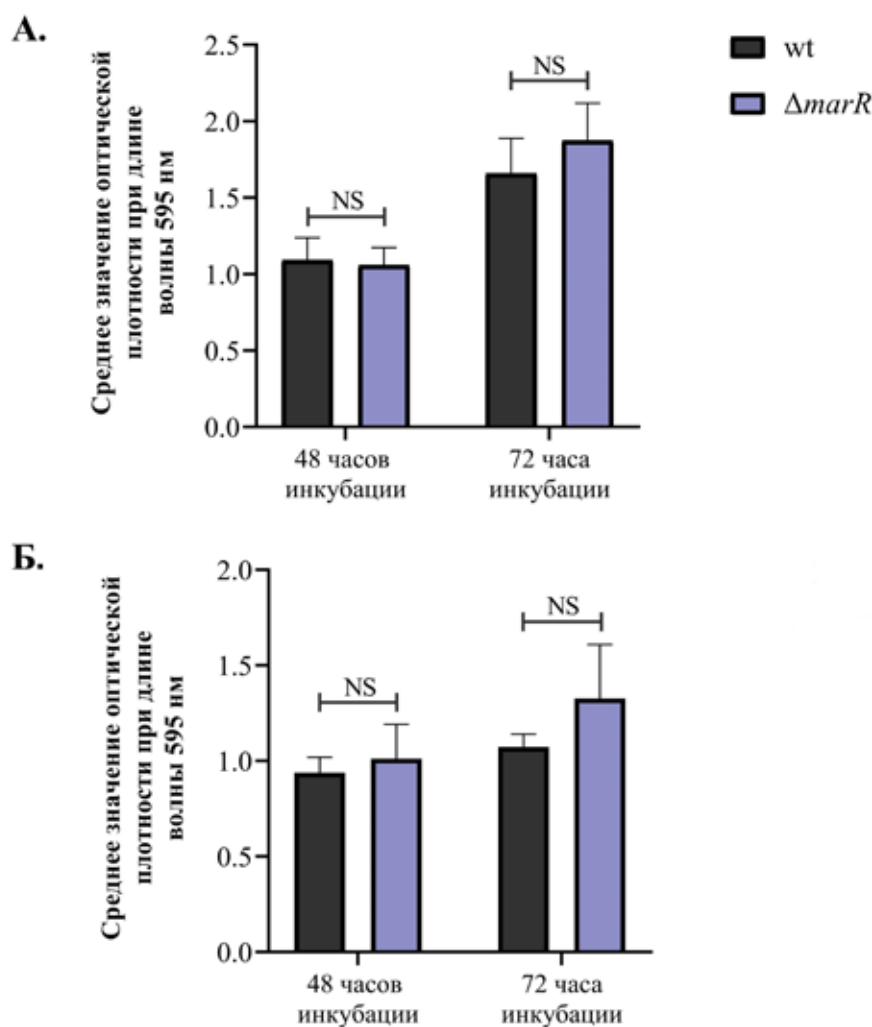


Рис. 3. Интенсивность формирования биопленок клетками штамма *ΔmarR* и штамма дикого типа в полноценной среде LB (А) (t-критерий Стьюдента в модификации Уэлча) и минимальной среде М9 (Б) (t-критерий Стьюдента в модификации Уэлча). NS — нет достоверных различий

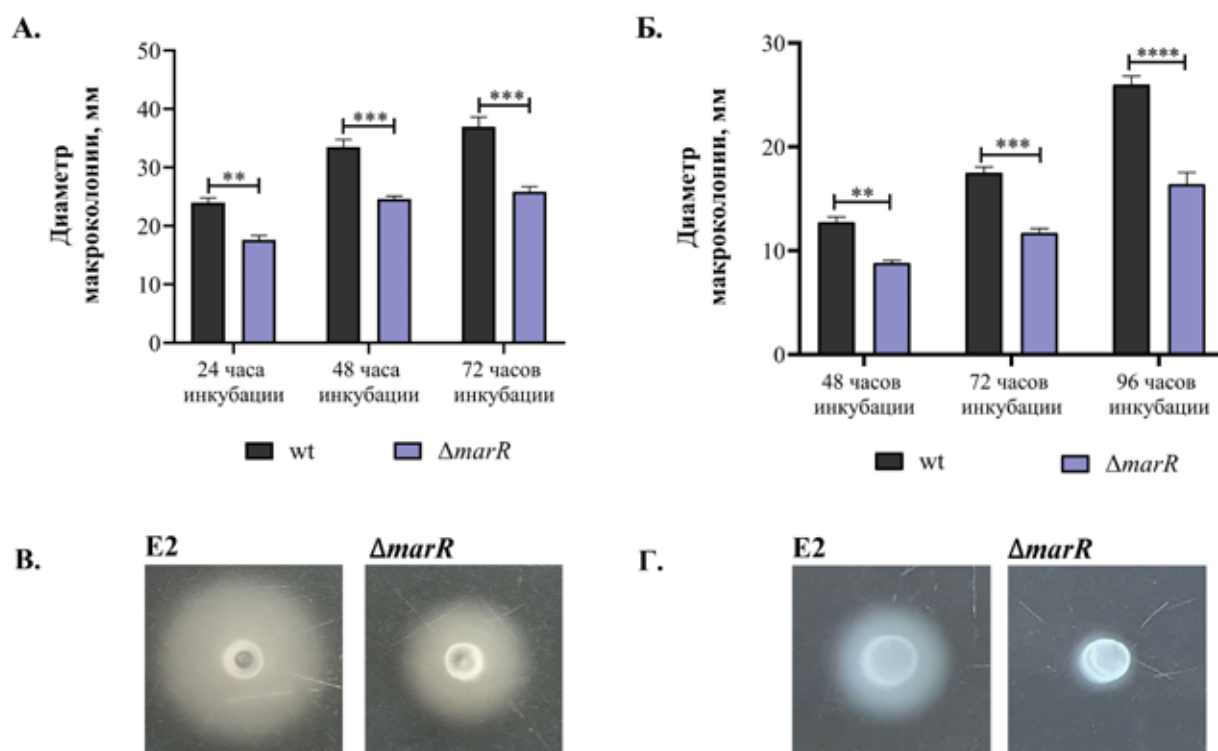


Рис. 4. Подвижность клеток бактерий *Erwinia amylovora* E2 и *Erwinia amylovora* $\Delta marR$ на полноценной среде LB (А) (t-критерий Стьюдента в модификации Уэлча) и минимальной среде М9 (Б) (t-критерий Стьюдента в модификации Уэлча). ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$. (В) Фотография бактериальных макроколоний спустя 24 ч инкубации при 28 °С на полноценной среде LB. (Г) Фотография бактериальных макроколоний спустя 48 ч инкубации при 28 °С на минимальной среде М9

клеток *Escherichia coli* [30]. Также было показано, что делеция гена *slyA* у *Dickeya zae* приводила к увеличению подвижности клеток патогена [9]. Поэтому на заключительном этапе нами была исследована подвижность клеток исследуемых штаммов *E. amylovora*. Как видно из рисунка 4, клетки *E. amylovora* $\Delta marR$ образовывали макроколонии намного меньшего диаметра как на полноценной, так и на минимальной средах культивирования по сравнению со значениями, полученными для E2.

Заключение

В настоящем исследовании мы сконструировали делеционный мутант *E. amylovora* по гену транскрипционного регулятора MarR и изучили его фенотип. Согласно нашим результатам, MarR прямо или косвенно контролирует подвижность клеток, продукцию экзополисахаридов левана и целлюлозы. Нарушение подвижности и синтеза левана клетками $\Delta marR$ может

быть причиной снижения их вирулентности по отношению к растениям груши. В совокупности наши результаты подтверждают идею о том, что MarR является плеiotропным регулятором, контролирующим уровень вирулентности *E. amylovora*.

Список использованных источников

1. Development of a novel biological control agent targeting the phytopathogen *Erwinia amylovora* / F. Dagher [et al.] // Heliyon. – 2020. – Vol. 6, № 10.
2. First Report of *Erwinia amylovora* Fire Blight in Belarus / A. L. Lagonenko [et al.] // Journal of Phytopathology. – 2008. – Vol. 156, № 10. – P. 638–640.
3. Virulence Factors of *Erwinia amylovora*: a Review / N. Pique [et al.] // International Journal of Molecular Sciences – 2015. – Vol. 16, № 6. – P. 12836–12845.
4. Castiblanco, L. F. New insights on molecular regulation of biofilm formation in plant-associated

- bacteria / L.F. Castiblanco, G.W. Sundin // *Journal of Integrative Plant Biology*. – 2016. – Vol. 58, № 4. – P. 362–372.
5. The multiple antibiotic resistance regulator MarR is a copper sensor in *Escherichia coli* / Z. Hao [et al.] // *Nature Chemical Biology*. – 2014. – Vol. 10, № 1. – P. 21–28.
6. Gupta, A. Redox-sensitive MarR homolog BifR from *Burkholderia thailandensis* regulates biofilm formation / A. Gupta, S. M Fuentes, A. Grove // *Biochemistry*. – 2017. – Vol. 56, № 17. – P. 2247–2348.
7. Vila, J. Salicylate increases the expression of marA and reduces in vitro biofilm formation in uropathogenic *Escherichia coli* by decreasing type 1 fimbriae expression / J. Vila, S. M. Soto // *Virulence*. – 2012. – Vol. 3, № 3. – P. 280–285.
8. TolC Promotes ExPEC Biofilm Formation and Curli Production in Response to Medium Osmolarity / B. Hou [et al.] // *Biomed research international*. – 2014. – P. 1–10.
9. SlyA regulates phytotoxin production and virulence in *Dickeya zeae* EC1 / J. N. Zhou [et al.] // *Molecular Plant Pathology*. – 2016. – Vol. 17, № 9. – P. 1398–1408.
10. Prajapat, M. K. Control of MarRAB Operon in *Escherichia coli* via Autoactivation and Autorepression / M.K. Prajapat, K. Jain, S. Saini // *Biophysical Journal*. – 2015. – Vol. 109, № 7. – P. 1497–1508.
11. MarR Family Transcription Factors from *Burkholderia* Species: Hidden Clues to Control of Virulence-Associated Genes / A. Gupta [et al.] // *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. – 2018. – Vol. 83, № 1. – P. 1–19.
12. McMurry, L. M. Amino acid residues involved in inactivation of the *Escherichia coli* multidrug resistance repressor MarR by salicylate, 2,4-dinitrophenol, and plumbagin / L. M. McMurry, S. B. Levy // *FEMS Microbiology Letters*. – 2013. – Vol. 349, № 1. – P. 16–24.
13. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* : in 3 vol. / ed.: J. Sambrook, D. W. Russel. – New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. – Vol. 3. – 1875 p.
14. Datsenko, K. A., Wanner, B. L. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products // *PNAS*. – 2000. – Vol. 97, № 12. – P. 6640–6645.
15. Nikolaichik, Y. Sigmoid: a user-friendly tool for improving bacterial genome annotation through analysis of transcription control signals / Y. Nikolaichik, A.U. Damienikan // *PeerJ*. – 2016. – e2056. doi:10.7717/peerj.2056.
16. NCBI BLAST: a better web interface / M. Johnson [et al.] // *Nucleic Acids Research*. – 2008. – Vol. 36, № 2, 1. – P. W5–W9. doi:10.1093/nar/gkn201.
17. AmyR Is a Novel Negative Regulator of Amylovoran Production in *Erwinia amylovora* / D. Wang [et al.] // *PLOS ONE*. – 2012. – Vol. 7, № 7. – P. 1–11.
18. Лысак, В. В. Микробиология. Практикум : пособие / В. В. Лысак, Р. А. Желдакова, О. В. Фомина. – Минск: БГУ. – 2015. – 115 с.
19. Zhao, Y. The *Erwinia amylovora* *avrRpt2EA* Gene Contributes to Virulence on Pear and *AvrRpt2EA* Is Recognized by *Arabidopsis* RPS2 When Expressed in *Pseudomonas syringae* / Y. Zhao, S.Y. He, G.W. Sundin // *Molecular Plant-Microbe Interactions*. – 2006. – Vol. 19, № 6. – P. 644–654.
20. Castiblanco, L. F. Cellulose production, activated by cyclic di-GMP through BcsA and BcsZ, is a virulence factor and an essential determinant of the three-dimensional architecture of biofilms formed by *Erwinia amylovora* Ea1189 / L. F. Castiblanco, G. W. Sundin // *Molecular Plant Pathology*. – 2018. – Vol. 19, № 1. – P. 90–103.
21. Geier, G. Characterization and influence on virulence of the levansucrase gene from the fireblight pathogen *Erwinia amylovora* / G. Geier, K. Geider // *Physiological and Molecular Plant Pathology*. – 1993. – Vol. 42, № 6. – P. 387–404.
22. Kharadi, R. R. Physiological and Microscopic Characterization of Cyclic-di-GMP-Mediated Autoaggregation in *Erwinia amylovora* / R. R. Kharadi, G. W. Sundin // *Frontiers in Microbiology*. – 2019.
23. Lee, J. H. Integration Host Factor Is Required for RpoN-Dependent *hrpL* Gene Expression and Controls Motility by Positively Regulating *rsmB* sRNA in *Erwinia amylovora* / J. H. Lee, Y. Zhao // *Phytopathology*. – 2016. – Vol. 106, № 1. – P. 29–36.
24. MarR-Family Transcription Factor HpaR Controls Expression of the *vgrR-vgrS* Operon of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* / Y. Pan [et al.] // *Molecular Plant-Microbe Interactions*. – 2018. – Vol. 31, № 3.
25. PrhN, a putative marR family transcriptional regulator, is involved in positive regulation of

type III secretion system and full virulence of *Ralstonia solanacearum* / Y. Zhang [et al.] // *Frontiers in Microbiology*. – 2015. – Vol. 6, № 357.

26. SlyA, a MarR Family Transcriptional Regulator, Is Essential for Virulence in *Dickeya dadantii* 3937 / M.M. Haque [et al.] // *Journal of Bacteriology*. – 2009. – Vol. 191, № 17. – P. 5409–5418.

27. Ellison, D. W. Regulation of virulence by members of the MarR/SlyA family / D. W. Ellison, V. L. Miller // *Current Opinion in Microbiology*. – 2006. – Vol. 9, № 2. – P. 153–159.

28. Biofilms: Survival and defense strategy

for pathogens / A. Kumar [et al.] // *International Journal of Medical Microbiology*. – 2017. – Vol. 307, № 8. – P. 481–489.

29. Kharadi, R. R. Dissecting the process of xylem colonization through biofilm formation in *Erwinia amylovora* / R. R. Kharadi, G. W. Sundin // *Journal of Plant Pathology*. – 2020. – P. 1–9.

30. HosA, a Member of the SlyA Family, Regulates Motility in Enteropathogenic *Escherichia coli* / M. J. Ferrandiz [et al.] // *Infection and Immunity*. – 2005. – Vol. 73, № 3. – P. 1684–1694.

K. Yu. Pesotskaya, A. L. Lagonenko, A. N. Evtushenkov

DISCOVERING THE ROLE OF THE TRANSCRIPTIONAL REGULATOR MARR IN THE VIRULENCE OF PHYTOPATHOGENIC BACTERIA *ERWINIA AMYLOVORA*

Belarussian State University
4 Nezavisimosty Ave., 220030 Minsk, Republic of Belarus
e-mail: karina345678@mail.ru

In this study, we have demonstrated that a mutation in the transcriptional regulator MarR gene of *Erwinia amylovora* is of a pleiotropic effect. *E. amylovora* Δ marR bacteria are characterized by reduced virulence in relation to vegetative pear plants, decreased production of levan exopolysaccharide and decreased motility. In addition, it has been shown that mutant's cells synthesize a greater amount of cellulose in comparison with the cells of wild-type bacteria. Thus, MarR is an important transcriptional regulator involved in the regulation of the synthesis of a large group of factors associated with *Erwinia amylovora* virulence.

Keywords: *Erwinia amylovora*, transcriptional regulator, fire blight, virulence factors, deletion mutant.

Дата поступления в редакцию: 2 сентября 2021 г.

В. А. Лемеш, В. Н. Кипень, М. В. Богданова, А. А. Буракова, О. И. Добыш, Н. И. Рябоконт,
Н. В. Никитченко, А. Н. Островская

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВОЗРАСТА ЧЕЛОВЕКА, ОСНОВАННОЕ НА АНАЛИЗЕ СТАТУСА МЕТИЛИРОВАНИЯ CpG-САЙТОВ В ДНК СПЕРМЫ

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

На основании биоинформатического и статистического анализа GEO-проектов по определению полногеномного профиля метилирования ДНК человека сформирован перечень из CpG-динуклеотидов с высоким прогностическим потенциалом для создания моделей предсказания возраста человека по образцам спермы. Определен уровень метилирования для 467 мужчин из Республики Беларусь, рассчитаны коэффициенты корреляции R и построены математические модели определения возраста человека. Среднее значение точности предсказания возраста по образцам спермы составило 3 года. Полученные результаты будут положены в основу при разработке калькуляторов предсказания возраста индивида по биологическим следам для экспертов-криминалистов.

Ключевые слова: криминалистика, определение возраста, сперма, метилирование ДНК, HumanMethylation450 BeadChip.

Введение

Одними из самых распространенных биологических образцов криминалистического характера являются следы спермы, особенно в отношении уголовных дел сексуального характера. Согласно статистическим данным за 2020 год в Республике Беларусь за преступления против половой неприкосновенности или половой свободы (ст. 166 и 167 УК РБ соответственно) было рассмотрено 127 дел [1]. Сексуальное насилие представляет собой любой вид вредного или нежелательного сексуального поведения в отношении другого человека [2]. Сексуальное насилие вне партнерских отношений сопряжено с оставлением на месте совершения преступления вещественных доказательств с наличием на них биологических следов человека, содержащих ДНК.

В мировой криминалистической практике определение генетического профиля подозреваемого с использованием STR-анализа (Short Tandem Repeat) является неотъемлемой процедурой при производстве уголовных дел, для которых в качестве вещественных доказательств имеются предметы с наличием на них биологических следов, в частности, спермы.

Как правило, в распоряжении следователя и эксперта-криминалиста имеется образец сравнения. В этом случае идентификация подозреваемого не вызывает затруднения, что позволяет провести генетическую идентификацию подозреваемого. Однако при отсутствии в базе данных генетического профиля, определенный на месте преступления STR-профиль индивида не позволяет сузить круг потенциальных преступников, т.к. ни во всех странах функционирует национальная база, охватывающая все население страны. В этой связи определение возраста по образцам спермы имеет важное значение в криминалистической практике, т.к. позволит акцентировать внимание следователя на индивидах из конкретных возрастных групп. В результате будут сэкономлены временные ресурсы, которые зачастую являются лимитирующим фактором в процессе расследования.

Для образцов спермы предложены методики для предположительного определения возраста неизвестного индивида по уровню прижизненной химической модификации (метилированию) ДНК [3–8]. Показано, что для анализа небольшого количества CpG-динуклеотидов

ДНК самым надежным для определения хронологического возраста, а именно: воспроизводимым, линейно-зависимым, чувствительным и специфичным является подход, основанный на выявлении уровня метилирования ДНК в конкретных CpG-сайтах [9–12]. Однако эффективность применения данной методики для определения возраста представителей населения регионов Союзного государства не установлена и требует специальных исследований, поскольку было показано, что уровень метилирования CpG-динуклеотидов может различаться у разных этногеографических групп и зависеть от условий окружающей среды [13, 14].

Цель работы — оценить точность предсказания возраста человека с использованием математических моделей на основании собственных результатов анализа метилирования CpG-динуклеотидов в образцах спермы мужчин из Республики Беларусь.

Материалы и методы

Биологические образцы

Образцы спермы от 382 мужчин получены на основании официального запроса в Республиканский Банк ДНК (Институт генетики и цитологии НАН Беларуси; тематическая секция «Банк ДНК человека»). Дополнительно 85 образцов спермы предоставлены добровольцами, обратившимися в Институт генетики и цитологии НАН Беларуси для анализа фрагментации ДНК. Сбор биологического материала был осуществлен с использованием процедур, одобренных Комитетом по биоэтике Института генетики и цитологии НАН Беларуси. Образцы спермы были получены путем мастурбации в стерильные пластиковые контейнеры после 3–5 дневного периода воздержания. Проведено микроскопическое исследование образцов спермы на наличие/отсутствие сперматозоидов. По результатам этого анализа все образцы, содержащие сперматозоиды, были включены в молекулярно-генетический анализ. Средний возраст участников исследования составил $34,2 \pm 5,2$ лет, диапазон возраста — от 22 до 53 полных лет. Согласно анкетным данным, все участники исследования проживали на территории Республики Беларусь и принадлежали к белорусскому этносу.

Аликвоты спермы по 200 мкл хранили при -20 °С в течение 4–6 месяцев, для более длительного хранения использовали низкотемпературный фризер (-80 °С). ДНК экстрагировали с использованием набора MagMAX™ DNA Multi-Sample Kit (ThermoFisher, США) в соответствии с инструкциями производителя. Выделенную ДНК количественно оценивали с использованием NanoPhotometer N50 (IMPLEN, США).

Подбор CpG-динуклеотидов для исследования образцов ДНК индивидов из Республики Беларусь проведен на основании биоинформатического и статистического анализа данных GEO-проектов. Информация об уровне метилирования ДНК, изученной в образцах спермы в рамках проекта GSE114753 с использованием ИММ 450K BeadChip (Illumina), получена из открытого доступа на платформе NCBI GEO datasets (Gene Expression Omnibus, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gds>) [5]. Представленная в базе данных выборка включала 141 образец, из них 69 пациентов, в анамнезе которых отмечено табакокурение, и 72 человека из группы сравнения (практически здоровые). Диапазон хронологического возраста — от 19 до 57 лет.

Отбор CpG-динуклеотидов для анализа

Нами проведен анализ существующих тест-систем, а также по данным GEO-проектов (www.ncbi.nlm.nih.gov/gds) выполнен самостоятельный биоинформатический поиск CpG-динуклеотидов с высоким потенциалом для определения возраста по образцам спермы.

Lee H. Y. et al. предложили использовать тест-систему для определения возраста по образцам спермы, включающую 3 CpG-динуклеотида — cg06304190 (ген *TTC7B*, NCBI Gene ID — 145567), cg06979108 (*NOX4*, 50507) и cg12837463 (располагается рядом с геном *TBX20*, 57057) [3]. Дополнительно нами отобраны для дальнейшего биоинформатического анализа и практической проверки методом SNaPshot 4 CpG-динуклеотида, для которых коэффициенты детерминации R^2 составили 0,4–0,5: cg00881487 (*MXRA5*, NCBI Gene ID — 25878), cg13030797, cg14750551 (*PARP14*, 54625), cg23488376 (*LINC01595*, 102725176) [1].

Также был проведен статистический анализ данных полногеномного профиля метилирования в рамках проекта GSE114753 [7],

по результатам которого были дополнительно отобраны 7 CpG-динуклеотидов: cg03762081, коэффициент детерминации $R^2 = 0,4285$ ($R = -0,6546$); cg04123357 (*COL18A1*, 80781), $R^2 = 0,473$ ($R = 0,688$); cg10836509, $R^2 = 0,511$ ($R = -0,715$); cg13014709 (*CDK4*, 1019), $R^2 = 0,460$ ($R = -0,678$); cg13837679 (*ALX4*, 60529), $R^2 = 0,473$ ($R = -0,688$); cg21843517 (*SNRNP35*, 11066), $R^2 = 0,429$ ($R = 0,655$); cg24958325 (*ANKMY1*, 51281), $R^2 = 0,355$ ($R = -0,596$).

Таким образом, на основании проведенного анализа для практической проверки нами отобраны 14 CpG-динуклеотидов, и для них

определен профиль метилирования в образцах спермы мужчин из Республики Беларусь.

Бисульфитное секвенирование с использованием SNaPshot

Праймеры для анализа CpG-динуклеотидов cg03762081, cg04123357, cg10836509, cg13014709, cg13837679, cg21843517 и cg24958325, смоделированные нами с использованием программы BiSearch (<http://bisearch.enzim.hu/>), представлены в таблице 1. Праймеры для анализа CpG-динуклеотидов cg06304190, cg06979108, cg12837463, cg00881487, cg13030797, cg14750551 и cg23488376 представлены в работе Lee H. Y. и др. [3].

Таблица 1

Информация о CpG-динуклеотидах, отобранных для исследования на основании биоинформатического анализа GSE114753

№№	CpG-динуклеотид	Ген	Хромосомная позиция*
1	cg03762081	–	Chr.19:g.51020309
	F-праймер (5'>3'): GAGGTTAAGAGAAATAGAAATAAG R-праймер (5'>3'): AATATAAAACAAAACCACAACCC SBE-олигонуклеотид (5'>3'): (T)n-AACACACACAAAААСТСАСТСАС		
2	cg04123357	<i>COL18A1</i>	Chr.21:g.45509586
	F-праймер (5'>3'): AGATGATATTTTGGTTAGTT R-праймер (5'>3'): АААСТАААСССТСТТАСТА SBE-олигонуклеотид (5'>3'): (T)n-САСТСАССАССРАСТАААААТС		
3	cg10836509	–	Chr.1:g.226111902
	F-праймер (5'>3'): GTTAGGTTTGGTGATGTAGT R-праймер (5'>3'): САААААСТТАААССТССААА SBE-олигонуклеотид (5'>3'): (T)n-АААСРСРТСТССТАСТАССТАС		
4	cg13014709	<i>CDK4</i>	Chr.12:g.57754606
	F-праймер (5'>3'): ТТАТАТАТТАААТТАТАААА R-праймер (5'>3'): АСТСАААСААТАТАСАСТТТАС SBE-олигонуклеотид (5'>3'): (T)n-САААТТТСААААТТТСС		
5	cg13837679	<i>ALX4</i>	Chr.11:g.44308365
	F-праймер (5'>3'): GTTTGTGAAAGAAGGAATTT R-праймер (5'>3'): ААТССАААСТААТААААААААСАС SBE-олигонуклеотид (5'>3'): (T)n-АССТАААААСААААААСТАААААСАС		

Коэффициенты R для 14 CpG-динуклеотидов, рассчитанные по результатам молекулярно-генетического анализа 467 образцов спермы, представлены в таблице 2.

Наибольшие абсолютные значения R (по модулю) показаны для CpG-динуклеотидов cg13014709 (–0,497), cg12837463 (–0,452), cg06304190 (–0,446), cg00881487 (–0,389)

и cg23488376 (–0,368). Для трех CpG-динуклеотидов корреляция с возрастом была положительной — cg21843517 (0,150), cg06979108 (0,242) и cg04123357 (0,276); для остальных CpG-динуклеотидов зависимость оказалась отрицательной. Для CpG-динуклеотида cg13837679 ассоциация с возрастом была статистически незначимой,

Таблица 2

Коэффициенты корреляции (R) CpG-динуклеотидов с возрастом

R (95% ДИ), р-уровень	CpG-динуклеотиды						
	cg00881487 (MXR45)	cg03762081	cg04123357 (COL18A1)	cg06304190 (TTC7B)	cg06979108 (NOX4)	cg10836509	cg12837463
НГ 95%	–0,301	–0,261	0,361	–0,369	0,326	–0,266	–0,373
R	–0,389	–0,348	0,276	–0,446	0,242	–0,351	–0,452
ВГ 95%	–0,222	–0,181	0,439	–0,282	0,402	–0,175	–0,289
р-уровень	2,93 ⁻¹¹	9,84 ⁻⁹	7,88 ⁻¹⁶	1,50 ⁻¹⁶	5,07 ⁻¹³	5,16 ⁻⁹	6,81 ⁻¹⁷
R (95% ДИ), р-уровень	CpG-динуклеотиды						
	cg13014709 (CDK4)	cg13030797	cg13837679 (ALX4)	cg14750551 (PARP14)	cg21843517 (SNRNP35)	cg23488376 (LINCO1595)	cg24958325 (ANKMY1)
НГ 95%	–0,422	–0,199	–0,071	–0,256	0,244	–0,294	–0,181
R	–0,497	–0,287	–0,156	–0,334	0,150	–0,368	–0,269
ВГ 95%	–0,331	–0,113	0,021	–0,176	0,331	–0,216	–0,091
р-уровень	1,28 ⁻²¹	1,48 ⁻⁵	0,124	2,02 ⁻⁸	9,20 ⁻⁸	9,71 ⁻¹¹	8,17 ⁻⁵

несмотря на то, что при биоинформатическом анализе данных проекта GSE114753 для него был выявлен высокий прогностический потенциал ($R = -0,456$; $p = 1,29 \cdot 10^{-8}$). Из-за отсутствия статистически значимой зависимости от возраста в белорусской популяции данный маркер в дальнейшем моделировании не использовался.

Регрессионная модель предсказания возраста

При создании модели предсказания возраста на основании уровня метилирования CpG-динуклеотидов в сперме использовался подход, согласно которому зависимость уровня метилирования ДНК от возраста рассматривалась как приближенная к линейной. В большинстве исследований используется именно данный подход. Однако, в отличие от моделей предсказания возраста по образцам крови или буккального эпителия, для моделей предсказания возраста по образцам спермы имеются свои особенности. Они обусловлены, в первую очередь, тем фактом, что CpG-динуклеотиды, специфичные для образцов спермы и линейно ассоциированные с возрастом с $R > 0,7-0,8$ по данным GEO-проектов, единичны. При практической проверке этих CpG-динуклеотидов с использованием технологии микросеквенирования SNaPshot выявленные зависимости, как правило, имеют менее выраженный характер.

Нами показано, что при применении множественной линейной регрессии (13 CpG-динуклеотидов) в качестве модели предсказания возраста по образцам спермы значение MAD составило 2,8 года (RMSE — 2,2 года), рисунок 1-А. Полученные нами результаты сопоставимы с аналогичными исследованиями, проведенными на различных популяциях человека [3–9]. Скорректированный процент объясненной дисперсии R^2 составил не менее 54,7%. По влиянию на изменение коэффициента детерминации (R^2) пять CpG-динуклеотидов расположились в следующей последовательности: cg13014709, cg06304190, cg04123357, cg12837463, cg06979108. Совокупный вклад остальных 8 маркеров составил не более 8,4%. Возраст с точностью до 3 лет корректно предсказан для 60,8% индивидов, с точностью до 5 лет — для 84,4%, для 15,6% ошибка предсказания возраста составила более 5 лет.

При использовании в множественной линейной регрессии только пяти CpG-динуклеотидов с максимальным влиянием на R^2 (cg13014709, cg06304190, cg04123357, cg12837463, cg06979108) значение MAD составило 3,0 года, RMSE — 2,3 года (рис. 1-В). Скорректированный процент объясненной дисперсии R^2 составил не менее 46,6%. Возраст с точностью до 3 лет корректно предсказан для 58,7% индивидов, с точностью до 5 лет — для 80,5% индивидов, для 19,5% индивидов ошибка предсказания возраста составила более 5 лет.

Таким образом, лучшая точность предсказания возраста мужчин по образцам спермы составила не более 2,8 года при анализе 13 CpG-динуклеотидов и 3,0 года при анализе только 5 CpG-динуклеотидов. На графике нестандартизованных остатков (рис. 1-а и 1-б) отсутствует смещение точек относительно центральной нулевой оси, что свидетельствует о равномерном распределении образцов с ошибкой предсказания возраста более 5 (при сортировке по переменной «Возраст»).

Вероятность отнесения образца к возрастной группе

Известно, что показатели R^2 , MAD и RMSE статистического анализа отражают общую точность модели и позволяют сравнивать модели между собой. Для характеристики точности предсказания зависимой переменной «Возраст» для конкретного образца целесообразно рассчитывать также вероятность отнесения образца к возрастной группе, например, « ≤ 30 лет», « >30 и ≤ 40 лет» и « >40 лет».

На рисунке 2 представлена информация о количестве индивидов, выраженном в процентах в пределах трех возрастных групп, для которых с использованием регрессионной модели из 5 CpG-динуклеотидов были предсказаны значения возраста в пределах ошибки « ≤ 3 лет», « >3 и ≤ 5 лет» и « >5 лет».

Наибольший процент корректных расчетов (ошибка предсказания менее 3 лет) приходится на возрастной диапазон « >30 и ≤ 40 лет», что может быть обусловлено объемом выборки (эта группа наиболее многочисленная). Из рисунка 2 следует также, что в группах « ≤ 30 лет» и « >40 лет» ошибка предсказания возраста постепенно возрастает — 21,0% и 39,5% соответственно (ошибка предсказания более

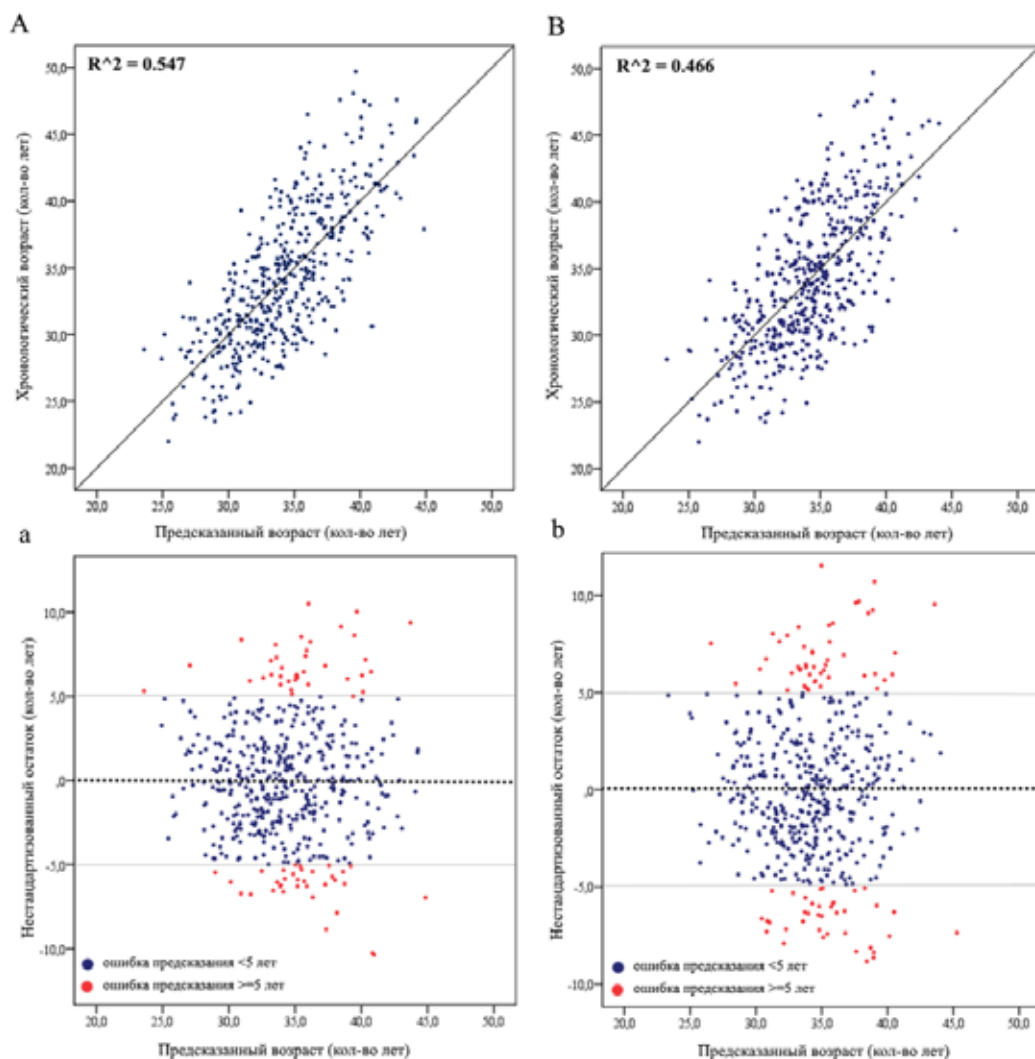


Рис. 1. А — точность предсказания возраста мужчины по образцам спермы с использованием 13 CpG-динуклеотидов; а — график нестандартизованных остатков для А; В — точность предсказания возраста мужчины по образцам спермы с использованием 5 CpG-динуклеотидов; б — график нестандартизованных остатков для В

5 лет). Для возрастной группы «>40 лет» это, вероятно, связано с возрастанием дисперсии для уровня метилирования анализируемых CpG-динуклеотидов с возрастом, что является следствием широкого диапазона нормы реакции физиологических процессов в организме человека.

Для криминалистов в судебной практике при выяснении предположительного возраста неизвестного индивида может быть важна информация не только о конкретном возрасте, но и об отнесении данного субъекта к определенной возрастной группе, например: «моложе 35 лет» или «старше 35 лет» и т.п. Точность отнесения неизвестного индивида к конкрет-

ной группе по результатам анализа метилирования CpG-динуклеотидов будет выше, чем при ответе на вопрос о приближенном к истинному значению хронологического возраста, т.к. количество групп в анализе с использованием, например, логистической регрессии, будет составлять в большинстве случаев не более двух. Например, при разбиении всего массива образцов на две категории: «моложе 35 лет» или «старше 35 лет», и использовании логистической регрессии на основании 5 CpG-динуклеотидов cg13014709, cg06304190, cg04123357, cg12837463, cg06979108, с вероятностью 84,4% можно сделать заключение, что возраст неизвестного индивида составляет

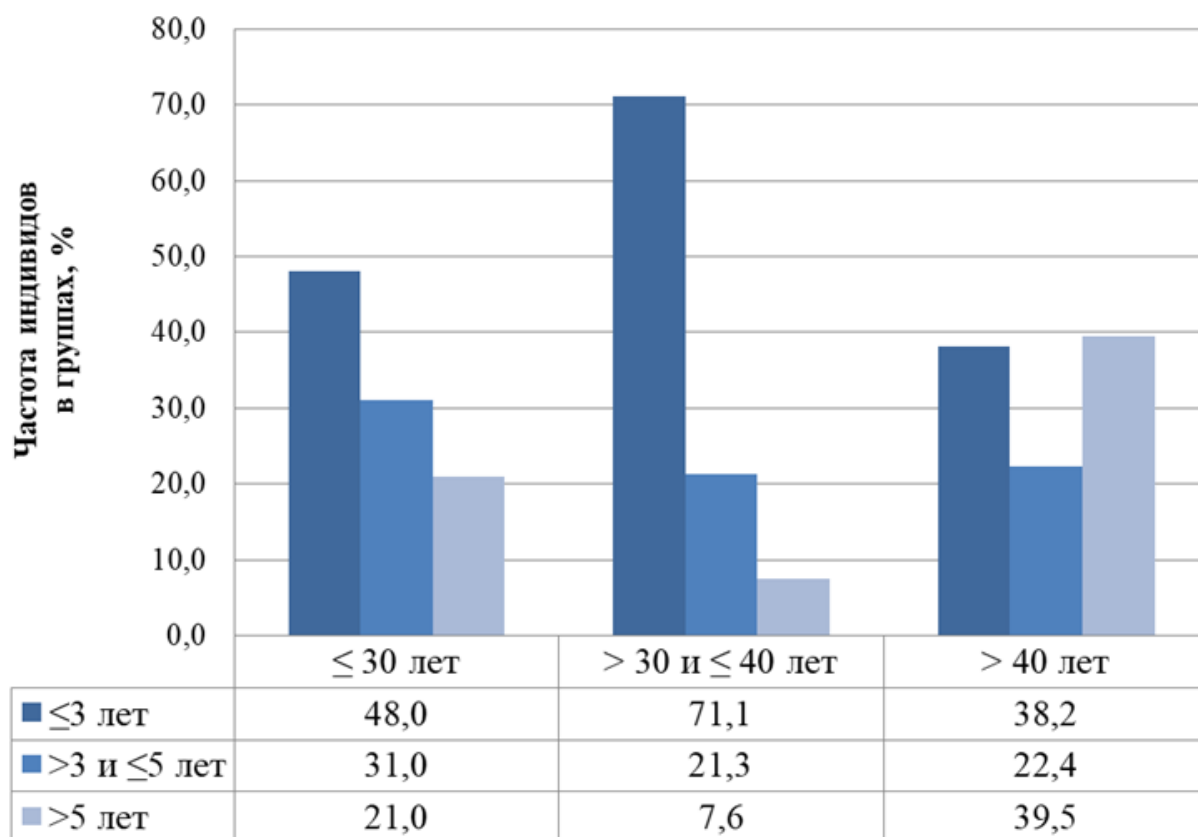


Рис. 2. Процент индивидов с корректно предсказанным возрастом в пределах заданных интервалов ошибки для трех возрастных групп

меньше 35 лет.

Для более точного предсказания возраста неизвестного индивида может быть использована двухэтапная схема: отнесение неизвестного образца к определенной возрастной группе; и определение значения возраста в годах (с уровнем точности в пределах предсказательной модели) уже в пределах возрастной группы.

Заключение

На основании данных, представленных в открытом доступе на платформе GEO NCBI для проектов по определению полногеномного профиля метилирования ДНК, определены CpG-динуклеотиды с высокими значениями линейной зависимости между уровнем метилирования и хронологическим возрастом человека для образцов спермы. Для молекулярно-генетического анализа отобраны 14 CpG-динуклеотидов с высоким прогностическим потенциалом для создания модели предсказания возраста мужчин. Для данных

CpG-динуклеотидов определен уровень метилирования в образцах спермы 467 индивидов из Республики Беларусь, рассчитаны коэффициенты корреляции R с возрастом. С использованием множественной линейной регрессии создана модель для предсказания возраста, основанная на анализе метилирования 5 CpG-динуклеотидов: cg13014709, cg06304190, cg04123357, cg12837463, cg06979108, отличающихся, по нашим данным, максимальной корреляцией с возрастом. Средняя ошибка определения возраста составила 3,0 года. Точность модели соответствует мировому уровню [1–6].

Предложенная нами модель предсказания возраста неизвестного индивида на основании профиля метилирования CpG-динуклеотидов в образцах спермы отличается относительной простотой. Для анализа используется всего пять генетических маркеров, и она может быть задействована в криминалистических лабораториях молекулярно-генетической направленности.

Разработанная нами методика определения возраста по образцам спермы на основе анализа профиля метилирования ДНК является результатом отечественных научно-технических исследований и обеспечивает использование актуальных знаний в области прикладной генетики при решении криминалистических задач на территории Республики Беларусь и Российской Федерации.

Работа выполнена в рамках мероприятия 2 «Разработка методики определения вероятного возраста индивида по характеристике его ДНК» научно-технической программы Союзного государства «Разработка инновационных геногеографических и геномных технологий идентификации личности и индивидуальных особенностей человека на основе изучения генофондов регионов Союзного государства» (ДНК-идентификация).

Все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствуют этическим стандартам институционального и/или национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 г. и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики.

От каждого из включенных в исследование участников было получено информированное добровольное согласие.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список использованных источников

1. Краткие статистические данные о деятельности судов общей юрисдикции по осуществлению правосудия за 2020 год [Электронный ресурс]. – Режим доступа: http://court.gov.by/ru/justice_rb/statistics/ – Дата доступа: 04.06.2021.
2. Распространенность насилия в отношении женщин в Республике Беларусь : по материалам НИР «Исследование безопасности семьи в Республике Беларусь» / Фонд ООН в области народонаселения в Республике Беларусь, Государственное научное учреждение «Институт социологии Национальной академии наук Беларуси». – Минск : Белсэнс, 2019. – 174 с. – ISBN 978-985-7179-01-5
3. Lee, H. Y. Epigenetic age signatures in the forensically relevant body fluid of semen: a preliminary study / H. Y. Lee [et al.] // Forensic Science International: Genetics. – 2015. – Vol. 19. – P. 28–34. DOI: 10.1016/j.fsigen.2015.05.014
4. Lee, H. Y. Genome-wide methylation profiling and a multiplex construction for the identification of body fluids using epigenetic markers / H. Y. Lee [et al.] // Forensic Science International: Genetics. – 2015. – Vol. 17. – P. 17–24. DOI: 10.1016/j.fsigen.2015.03.002
5. Alsaleh, H. A multi-tissue age prediction model based on DNA methylation analysis / H. Alsaleh [et al.] // Forensic Science International: Genetics Supplement Series. – 2017. – Vol. 6. – P. 62–64. DOI: 10.1016/j.fsigss.2017.09.056
6. Li, L. Age-associated DNA methylation determination of semen by pyrosequencing in Chinese Han population / L. Li [et al.] // Forensic Science International: Genetics Supplement Series. – 2017. – Vol. 6. – P. e99–e100. DOI: 10.1016/j.fsigss.2017.09.042
7. Jenkins, T. G. Cigarette smoking significantly alters sperm DNA methylation patterns / T. G. Jenkins [et al.] // Andrology. – 2017. – Vol. 5(6). – P. 1089–1099. DOI: 10.1111/andr.12416
8. Lee, J. W. A validation study of DNA methylation-based age prediction using semen in forensic casework samples / J. W. Lee [et al.] // Legal Medicine (Tokyo). – 2018. – Vol. 31. – P. 74–77. DOI: 10.1016/j.legalmed.2018.01.005
9. Кильчевский, А. Генетика — судебной экспертизе Беларуси / А. Кильчевский [и др.] // Наука и Инновации. – 2020. – № 10(212). – С. 22–28.
10. Hannum, G. Genome-wide methylation profiles reveal quantitative views of human aging rates / G. Hannum [et al.] // Molecular Cell. – 2013. – Vol. 24. – P. 359–367. DOI: 10.1016/j.molcel.2012.10.016
11. Kurdyukov, S. DNA Methylation Analysis: Choosing the Right Method / S. Kurdyukov, M. Bullock // Biology (Basel). – 2016. – Vol. 6;5(1). – P. e1–e21. DOI: 10.3390/biology5010003
12. Goel, N. Role of DNA methylation in human age prediction / N. Goel, P. Karir, V. K. Garg // Mechanisms of Ageing and Development. – 2017. – Vol. 166. – P. 33–41. DOI: 10.1016/j.mad.2017.08.012
13. Fleckhaus, J. Impact of genetic ancestry on chronological age prediction using DNA methylation analysis / J. Fleckhaus [et al.] // Forensic Science International: Genetics. Supplement Series.

- 2017. – Vol.6. – P. e399–e400. DOI: 10.1016/j.fsigss.2017.09.162
14. Donkin, I. Sperm epigenetics and influence of environmental factors / I. Donkin, R. Barres // *Molecular Metabolism*. – 2018. – Vol. 14. – P. 1–11. DOI:10.1016/j.molmet.2018.02.006

**V. A. Lemesh, V. N. Kipen, M. V. Bahdanava, A. A. Burakova, O. I. Dobysh,
N. I. Ryabokon, N. V. Nikitchenko, A. N. Ostrovskaya**

DETERMINATION OF HUMAN AGE BASED ON THE ANALYSIS OF THE STATUS OF CpG SITES METHYLATION IN SPERM DNA

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

Based on bioinformatics and statistical analysis of GEO-projects on the determination of the genome-wide profile of human DNA methylation, a list of CpG dinucleotides with high predictive potential was formed to design models allowing to predict human age by sperm samples. The methylation level was determined for 467 males from the Republic of Belarus. The correlation coefficients R were calculated, and mathematical models for determining the age of an individual were constructed. The average value of the accuracy of age prediction by sperm samples using 5 CpG-dinucleotides was 3 years. The results obtained will be used as a basis for the development of calculators for predicting the age of an individual based on the traces of biological character for forensic experts.

Keywords: forensic, age determination, sperm, DNA methylation, HumanMethylation450 BeadChip.

Дата поступления в редакцию: 10 июня 2021 г.

Е. В. Кобец¹, Э. В. Руденко², Е. В. Руденко³, О. Ю. Самоховец³, Т. Г. Капустина⁴, П. М. Морозик^{1,4}

АНАЛИЗ АССОЦИИИ ПОЛИМОРФНЫХ ВАРИАНТОВ ГЕНОВ *VDR* И *MTHFR* СО СТАТУСОМ ВИТАМИНА D У БЕЛОРУССКИХ ЖЕНЩИН

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

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

³Белорусская медицинская академия последиplomного образования
Республика Беларусь, 220013, г. Минск, ул. П. Бровки, 3, корпус 3

⁴Международный государственный экологический институт им. А. Д. Сахарова БГУ
Республика Беларусь, 220070, г. Минск, ул. Долгобродская, 23/1

Витамин D важен для здоровья костей, участвует в поддержании иммунной системы и клеточной пролиферации. Статус витамина D является серьезной проблемой здравоохранения во всем мире. Варианты генов, участвующих в метаболизме витамина D, могут быть ассоциированы с его уровнем и эффективностью витаминной поддержки. Целью данной работы является анализ ассоциации вариантов гена *VDR* rs7975232, rs1544410, rs731236, rs2228570 и rs11568820, *MTHFR* rs1801133 с уровнем витамина D у белорусских женщин. В исследовании приняло участие 602 человека, соответствующих критериям включения. По результатам исследования установлена ассоциация вариантов rs1544410 T/T и rs731236 G/G с повышенным, а также rs11568820 A/G + A/A и rs1801133 A/A с пониженным уровнем витамина D. У носителей аллельной комбинации G-G-G по этим маркерам существенно повышен уровень витамина ($\beta = 3,5$; 95% ДИ 1,4–5,7; $p = 0,0015$). Выявленные маркеры могут играть важную роль в оптимизации витаминной поддержки и профилактике ряда социально-значимых заболеваний.

Ключевые слова: дефицит витамина D, статус витамина D, генетический полиморфизм, ген *VDR*, ген *MTHFR*.

Введение

В соответствии с современной концепцией витамин D представляет собой стероидный прогормон, так как превращается в организме в активную форму после двухступенчатого процесса метаболизирования и реализует разнообразные биологические эффекты путем взаимодействия со специфическими рецепторами в ядрах клеток различных органов и тканей [1]. В многочисленных исследованиях установлено, что разнообразные биологические действия витамина D реализуются путем изменений экспрессии генов, которые опосредованы взаимодействием его активной формы (1,25-дигидроксивитамина D или кальцитриола) с внутриклеточным рецептором витамина D (vitamin D receptor — VDR). Активация VDR

при прямом взаимодействии с кальцитриолом вызывает связывание рецептора с регуляторными областями генов-мишеней и инициирует образование белковых комплексов, необходимых для направленных изменений транскрипции и осуществления конкретных биологических реакций [2]. Основная роль витамина D заключается в регуляции кальций-фосфорного обмена и костного метаболизма. Именно эти эффекты витамина D были впервые открыты в контексте изучения такого значимого заболевания, как рахит, их часто называют классическими эффектами. Открытие и изучение *VDR* показало, что биологические эффекты витамина D выходят за рамки обеспечения метаболизма кальция и фосфора. Так, витамин D принимает участие в регуляции деятельности

сердечно-сосудистой, аутоиммунной, пищеварительной, дыхательной и многих других систем человеческого организма [3].

Концентрация общего гидроксивитамина D (25(OH)D) в сыворотке является наиболее достоверным показателем для оценки и мониторинга статуса витамина D, поскольку отражает суммарное количество витамина D, производимого в коже и получаемого с пищевыми продуктами и препаратами витамина D (25(OH)D₂ и 25(OH)D₃), и имеет продолжительный период полураспада в крови — около 15 дней [4]. Вопрос о том, какие показатели 25(OH)D соответствуют нормальному уровню и адекватной обеспеченности витамином D, остается предметом дискуссий. Руководства некоторых медицинских сообществ и организаций расценивают оптимальный уровень как значения гидроксивитамина D более 20 нг/мл, в то же время многие эксперты считают, что уровни между 20–30 нг/мл должны расцениваться как недостаточность витамина D, а нормальные показатели обеспеченности витамином D соответствуют концентрации 25(OH)D более 30 нг/мл. Более того, подчеркивается, что поддержание 25(OH)D на уровне не менее 20 нг/мл обеспечивает классические эффекты витамина D, связанные с регуляцией кальций-фосфорного метаболизма, а для проявления плеiotропных внескелетных эффектов необходимы более высокие концентрации — 30–60 нг/мл [5]. В связи с этим поддержание адекватного статуса витамина D необходимо не только с целью профилактики рахита, нарушений кальций-фосфорного и костного обмена, но и раннего развития и тяжелого течения многих социально значимых заболеваний.

Целью настоящего исследования является анализ ассоциации вариантов генов *VDR* (рецептора витамина D) и *MTHFR* (метилентетрагидрофолатредуктазы) с уровнем витамина D в сыворотке крови. Однонуклеотидные варианты генов *VDR* ApaI rs7975232, BsmI rs1544410, TaqI rs731236, FokI rs2228570 и Cdx2 rs11568820; *MTHFR* C677T rs1801133 были отобраны на основании их участия в метаболизме витамина D.

Рецептор витамина D (*VDR*) — ядерный гормональный рецептор из суперсемейства ядерных рецепторов. Белок *VDR* содержит ДНК-связывающий, активирующий транс-

крипцию и лиганд-связывающий домены. Действие витамина D и *VDR* тесно связано с гормонами щитовидной железы: кальцитонином и паратиреоидным гормоном. Ген *VDR* локализован на длинном плече 12-й хромосомы (12q12-14) и состоит из 10 экзонов размером около 75 тыс. п. н. [6]. Описано около 300 полиморфных вариантов гена *VDR*. Даже небольшая модификация гена может повлиять на структуру и функциональную активность рецептора. Полиморфизм гена *VDR* может быть связан с различными биологическими эффектами на витамин D. Полиморфные варианты *VDR* ApaI (rs7975232), BsmI (rs1544410) и TaqI (rs731236) расположены на 3'-нетранслируемом конце. Полиморфные варианты не приводят к замене аминокислотной последовательности кодируемого белка, но влияют на экспрессию генов, регулируя стабильность мРНК [7]. Вариант *VDR* FokI (rs2228570, с.2Т > С, р. Met1Arg) расположен в кодирующей области гена *VDR* (экзон 2) и приводит к потере инициации трансляции, в результате чего образуется более короткий и более активный рецепторный белок [8]. Замена *VDR* Cdx2 (rs11568820) расположена в промоторной области и вызывает усиление транскрипционной активности на 30% [9].

Ген *MTHFR* расположен на первой хромосоме (1р36.2) и кодирует фермент, катализирующий превращение 5,10-метилентетрагидрофолата в 5-метилентетрагидрофолат в фолатном цикле, таким образом принимая участие в обмене гомоцистеина. Наиболее изученным полиморфным вариантом этого гена является C677T (rs1801133). Замена в аминокислотной последовательности аланина на валин приводит к нарушению фолатного метаболизма, результатом чего является повышение уровня гомоцистеина [10].

Материалы и методы

Характеристика исследуемой группы

В поперечное когортное исследование были включены женщины, проходившие амбулаторное обследование в Минском городском центре остеопороза и болезней костно-мышечной системы и ревматологическом отделении 1-й Минской городской больницы (Минск, Беларусь). Протокол исследования одобрен Локальным этическим комитетом Белорус-

ской медицинской академии последипломного образования. Все участники исследования подписали письменное информированное согласие в соответствии с Хельсинкской декларацией (в редакции 2013 г.). Критерии включения: согласие на участие в исследовании; отсутствие заболеваний, влияющих на метаболизм витамина D. Критерии исключения для взрослых пациентов с заболеваниями костно-мышечной системы: наличие сопутствующих заболеваний, оказывающих влияние на метаболизм витамина D (патология желудочно-кишечного тракта, нарушения функции щитовидной железы, сахарный диабет). Все участники исследования принимали добавки кальция в форме карбоната кальция, эквивалентного 500 мг элементарного кальция, а также получали ежедневную дозу 400–800 международных единиц (МЕ) холекальциферола в соответствии с европейскими рекомендациями [11].

Клинические методы обследования

Клиническое исследование пациентов включало сбор анамнеза согласно утвержденному протоколу, измерение длины тела и массы тела, расчет индекса массы тела (ИМТ) по стандартной методике. Блок вопросов по сбору анамнеза включал информацию о наличии заболеваний, ассоциированных с нарушениями метаболизма витамина D (заболевания желудочно-кишечного тракта, аутоиммунные, кожные заболевания, эндокринная патология, болезни почек, печени), и других факторах риска гиповитаминоза D (гиподинамия, недостаточное пребывание на солнце, пожилой возраст, фотосенсибилизация и др.). Уточнялась информация о приеме препаратов холекальциферола: какие препараты принимал пациент, их дозировка и длительность приема. Забор крови натощак для биохимического и электрохемилюминесцентного анализов крови осуществлялся из локтевой вены утром, не ранее чем через 10–12 часов после последнего приема пищи, в стерильную вакуумную пробирку Vacutainer. Определение витамина D в сыворотке крови проводили с помощью электрохемилюминесцентного иммуноанализа на анализаторе Cobas e411 (Roche Diagnostic, Швейцария). Уровень 25(OH)D (общего гидроксивитамина D) считался нормой при значении в сыворотке крови >30 нг/мл, недоста-

точным — на уровне 20–30 нг/мл, дефицитом — менее 20 нг/мл [12].

Генетические исследования

Геномную ДНК выделяли из цельной крови с помощью стандартной фенол-хлороформной экстракции. Генотипирование осуществляли с помощью количественной полимеразной цепной реакции (ПЦР) с зондами TaqMan (Thermo Scientific, США) на приборе CFX96 (Bio-Rad, США) по ранее описанным методикам [13, 14]. Полный объем реакции в пробирках для ПЦР составлял 10 мкл, включая 5 мкл iTaq Universal Probes Supermix (BioRad), 3,75 мкл воды milliQ, 0,25 мкл \times 40 TaqMan SNP Genotyping Assay, 1 мкл геномной ДНК (15 нг). Реакцию проводили с начальной денатурацией при 95 °С в течение 10 мин, затем 40 циклов денатурации при 95 °С в течение 15 с, отжига и синтеза при 60 °С в течение 30 с. Во время каждой постановки ПЦР применяли положительный и отрицательный контроли, в целях контроля качества некоторые образцы, отобранные в случайном порядке, генотипировали повторно.

Статистический анализ

Вся статистическая обработка результатов и построение графиков осуществлялась с использованием языка программирования R (в свободном доступе на <http://r-project.org>). Количественные показатели представлены в виде медианы (25%, 75% межквартильный размах) и сравнивались с помощью U-критерия Манна-Уитни. Генетический риск дефицита витамина D оценивали методом расчета отношения шансов с 95% доверительным интервалом (ДИ) в сравнении с референсным (наиболее распространенным гомозиготным) генотипом с использованием кодоминантной (общей) модели наследования; в случае, когда частота минорного аллеля (MAF) была ниже 0,1%, использовали доминантную модель наследования. Для корректировки по сопутствующим факторам (масса тела) применяли модель многомерной линейной регрессии, для анализа распределения количественных переменных между генотипами и группами по статусу витамина D — тест ANOVA. Значение бета (β) характеризует разницу значений количественных признаков среди носителей различных генотипов. Анализ неравновесного сцепления

(LD) проводился с использованием R-пакетов «haplo.stats» (v.1.7.9) и «SNPassoc» (v.1.9-2), аллельные комбинации сконструированы и проанализированы на предмет связи с уровнем витамина D с помощью модели GLM, теста отношения правдоподобия и алгоритма ожидания-максимизации (EM). Различия между группами считали статистически значимыми при $p < 0,05$ с поправкой на множественное тестирование с использованием коэффициента

ложного обнаружения (p_{FDR}) по методу Бенджамини-Хохберга ($n = 6$).

Результаты и обсуждение

Всего для участия в исследовании было отобрано 602 человека, соответствовавших критериям включения и подписавших информированное согласие. Клинические характеристики проанализированных групп представлены в таблице 1. Средний возраст всех пациенток со-

Таблица 1

Клинические характеристики групп, включенных в исследование

Показатель	Общая когорта	Группы по статусу витамина D			P_{ANOVA}
		норма	недостаточность	дефицит	
п, чел	602	158	241	203	
Возраст, лет	62,4 (58,0; 68,0)	62,9 (58,0; 69,0)	62,5 (58,0; 69,0)	61,7 (56,5; 68,0)	0,22
Масса тела, кг	72,4 (61,0; 82,0)	68,2 (61,0; 78,0)	73,2 (62,0; 82,0)	77,6 (67,7; 87,0)	$6,5 \times 10^{-9}$
Рост, см	159,8 (155,0; 164,0)	159,7 (155,0; 164,0)	159,9 (156,0; 164,0)	160,0 (155,0; 164,0)	0,69
Индекс массы тела (ИМТ), кг/м ²	28,4 (23,8; 32,0)	23,9 (18,6; 24,2)	29,4 (28,7; 30,9)	29,4 (26,9; 32,5)	$1,4 \times 10^{-8}$
25-гидроксивитамин D (25(OH)D), нг/мл	25,5 (18,1; 30,7)	32,9 (31,1; 33,3)	23,9 (21,9; 24,5)	15,0 (10,7; 19,5)	$2,0 \times 10^{-16}$

ставлял 62,4 года; средняя масса тела, рост и ИМТ составляли 72,4 кг, 159,8 см и 28,4 кг/м² соответственно. Уровень 25(OH)D в сыворотке крови исследуемых лиц варьировал от 7,4 до 70 нг/мл, средний уровень составил 25,5 (18,1; 30,7) нг/мл.

Исследуемые группы в зависимости от статуса витамина D не отличались по возрасту и росту (по тесту ANOVA $p > 0,1$ во всех случаях). В то же время были выявлены существенные различия между группами по массе тела и ИМТ: среди лиц с нормальным статусом витамина D масса тела была ниже по сравнению с группами, у которых наблюдались недостаточность и дефицит витамина ($p < 0,01$).

У лиц с недостаточностью и дефицитом витамина D (гиповитаминозом D) наблюдалась избыточная масса тела (ИМТ в интервале от 25 до 30 кг/м², табл. 1) [15]. Высокая распространенность дефицита витамина D у лиц с избыточной массой тела была показана во многих исследованиях, однако механизмы, лежащие в основе этой зависимости, до сих пор не установлены [16]. По этой причине в ходе анализа ассоциации локусов с уровнем витамина D результаты были скорректированы по массе тела.

Все участники исследования были прогенотипированы по 6 локусам генов *VDR* и *MTHFR*. Эти гены участвуют в метаболизме

витамина D. Эффект витамина D опосредуется связыванием со специфическим стероидным рецептором с транскрипционной активностью, регулируя таким образом синтез белка. Полиморфизм гена *VDR* может способствовать модификации структуры рецептора и его функциональности, что может способствовать изменению концентрации 25(OH)D в сыворотке крови. Ранее уже предполагали, что полиморфизм гена *VDR* может влиять на уровень витамина D, и этот эффект варьирует в различных популяциях [17, 18], однако комплексные исследования ранее не проводились.

В настоящем исследовании мы проанализи-

ровали связь пяти наиболее часто изучаемых вариантов гена *VDR* и одного варианта гена *MTHFR* с концентрацией 25(OH)D в сыворотке крови у белорусских женщин для подтверждения их связи на независимой когорте. Частоты минорных аллелей всех проанализированных локусов существенно не отличались от данных GnomAD для европейской популяции [19]. Результаты генотипирования соответствуют ожидаемому равновесию Харди-Вайнберга на уровне 5% в общей группе ($p > 0,1$ для всех вариантов генов).

Результаты анализа ассоциации уровня 25(OH)D в сыворотке крови с вариантами

Таблица 2

Ассоциация уровня 25(OH)D в сыворотке крови с полиморфными вариантами генов *VDR* и *MTHFR*

Ген, локус	Генотип	Частота, %	25(OH)D, нг/мл ср.зн. ± ст.ош.*	P_{FDR}	$P_{adj\ FDR}^{**}$
<i>VDR</i> rs7975232	C/C	28,4	24,9 ± 0,9	0,15	0,25
	A/C	45,0	24,9 ± 0,7		
	A/A	26,6	27,0 ± 0,9		
<i>VDR</i> rs1544410	C/C	31,4	24,5 ± 0,8	0,017	0,05
	C/T	45,0	24,7 ± 0,7		
	T/T	23,6	28,1 ± 1,0		
<i>VDR</i> rs731236	A/A	30,4	24,0 ± 0,8	0,0027	0,016
	A/G	45,6	24,8 ± 0,6		
	G/G	24,0	28,6 ± 1,0		
<i>VDR</i> rs2228570	G/G	28,6	25,9 ± 0,9	0,22	0,13
	G/A	46,7	25,9 ± 0,7		
	A/A	24,7	24,1 ± 0,8		
<i>VDR</i> rs11568820	G/G	68,1	26,2 ± 0,6	0,092	0,26
	G/A	29,5	24,0 ± 0,7		
	A/A	2,4	23,5 ± 3,5		
	G/A + A/A***	31,2	23,4 ± 0,7		
<i>MTHFR</i> rs1801133	G/G	43,8	28,0 ± 0,9	0,012	0,015
	G/A	40,8	26,8 ± 0,8		
	A/A	15,2	22,5 ± 1,5		

* среднее значение ± стандартная ошибка;
 ** результаты скорректированы по массе тела;
 *** расчеты произведены для доминантной модели наследования

включенных в исследование генов представлены в таблице 2.

По результатам исследования выявлена статистически значимая ассоциация локусов rs1544410, rs731236 и rs1801133 с уровнем 25(OH)D в сыворотке крови, которая сохранилась после коррекции. Для вариантов rs1544410 и rs731236 гена *VDR* самый низкий уровень 25(OH)D был характерен для носителей референсного генотипа, промежуточный — для гетерозиготных и самый высокий — для носителей минорных гомозиготных генотипов ($p_{ANOVA} = 0,0055$ и $0,00045$ соответственно). Для носителей генотипа rs1544410 Т/Т концентрация 25(OH)D была на 3,6 нг/мл выше по сравнению с носителями генотипа С/С ($p_{FDR} = 0,017$), причем эта ассоциация сохранилась после коррекции по массе тела ($p_{adj\ FDR} = 0,05$).

Для носителей генотипа rs731236 G/G разница составила 4,6 нг/мл ($p_{FDR} = 0,003$, $p_{adj\ FDR} = 0,02$). Обратная зависимость была выявлена для варианта rs11568820 гена *VDR* — среди носителей референсных гомозигот G/G уровень 25(OH)D был выше по сравнению с A/G + A/A. Однако после коррекции эта ассоциация осталась на уровне тенденции (табл. 2). Схожие ассоциации ранее были выявлены у представителей других европейских популяций [20, 21].

Среди носителей генотипа A/A по локусу rs1801133 гена *MTHFR* средний уровень витамина D в сыворотке крови был ниже на 5,5 нг/мл по сравнению с G/G ($p_{FDR} = 0,012$). Этот эффект сохранился после коррекции и может

быть обусловлен тем, что вариант rs1801133 ассоциирован со сниженной активностью фермента метилентетрагидрофолатредуктазы и гипергомоцистеинемией, при которой часто характерен дефицит витамина D [22].

Ранее нами было показано, что между вариантами rs7975232, rs1544410 и rs731236 гена *VDR* выявлена статистически значимая высокая степень неравновесного сцепления [14], в результате которого мажорные аллели одних маркеров наследовались преимущественно с мажорными аллелями других маркеров. В исследовании был выявлен гаплотип А-Т-Г, среди носителей которого уровень сывороточного 25(OH)D был ниже на 2 нг/мл по сравнению с референсным гаплотипом С-С-А (95% ДИ 0,7–3,4; $p = 0,017$). Учитывая, что наличие высокой степени неравновесного сцепления может способствовать ошибочному выявлению статистически значимой ассоциации для маркеров, находящихся в сцеплении, в дальнейшей работе был проведен анализ аллельных комбинаций маркеров *VDR* rs731236, rs11568820 и *MTHFR* rs1801133. Между этими локусами отсутствует неравновесное сцепление и для них установлена статистически значимая ассоциация с уровнем витамина D в сыворотке крови (табл. 2). Анализ распределения частот комбинаций позволяет повысить статистическую мощность исследования и выявить потенциальные межгенные взаимодействия. Результаты представлены в таблице 3.

Комплексный анализ по трем маркерам, участвующим в метаболизме витамина D, позволил выделить 8 аллельных комбинаций

Таблица 3

Ассоциация аллельных комбинаций локусов *VDR* rs731236, rs11568820 и *MTHFR* rs1801133 с уровнем витамина D в сыворотке крови

Аллельная комбинация	Частота, %	25(OH)D, нг/мл сп. зн. ± ст. ош.*	β (95% ДИ),** нг/мл	p
A-G-G	28,1	24,2 ± 1,4	–	–
G-G-G	26,9	27,7 ± 1,1	3,5 (1,4; 5,7)	0,0015
A-G-A	16,2	23,5 ± 1,5	–0,7 (–3,6; 2,2)	0,64
G-G-A	11,7	24,0 ± 1,2	–0,2 (–2,5; 2,3)	0,91
G-A-G	5,0	23,7 ± 1,8	0,5 (–3,0; 4,0)	0,76
A-A-G	4,8	23,0 ± 2,4	–1,2 (–5,8; 3,5)	0,62

Окончание таблицы 3

Аллельная комбинация	Частота, %	25(OH)D, нг/мл ср. зн. ± ст. ош.*	β (95% ДИ),** нг/мл	<i>p</i>
A-A-A	3,8	22,9 ± 2,1	-1,4 (-5,6; 2,8)	0,53
G-A-A	3,5	21,9 ± 2,3	-2,3 (-6,9; 2,3)	0,32

* среднее значение ± стандартная ошибка;
** β — разница по сравнению с референсным значением

Примечание. В качестве референсного принят уровень витамина D у носителей наиболее распространенного гомозиготного генотипа

(табл. 3). Частота встречаемости всех комбинаций в исследуемой группе составила более 3%. Только для аллельной комбинации G-G-G были выявлены статистически значимые различия в концентрации сывороточного витамина D по сравнению с наиболее распространенной референсной A-G-G (общая частота 28,1%, среднее значение витамина D составило $24,2 \pm 1,4$ нг/мл). Среди носителей G-G-G (общая частота 26,9%) уровень 25(OH)D был значительно выше по сравнению с референсной A-G-G ($\beta = 3,5$; 95% ДИ 1,4–5,7, $p = 0,0015$), что вполне ожидаемо, поскольку она состоит из аллелей, ассоциированных с повышенным уровнем витамина. Для других аллельных комбинаций не было выявлено статистически

значимых ассоциаций с уровнем витамина D. Тем не менее, можно отметить, что у носителей комбинации A-A-A, состоящей из аллелей, ассоциированных с недостаточностью витамина D, его концентрация на 1,4 нг/мл ниже по сравнению с референсной комбинацией.

В дальнейшей работе мы также оценили распределение генотипов по каждому исследуемому маркеру в группах в соответствии с уровнем витамина D (норма, недостаточность, дефицит). Результаты были скорректированы по массе тела и представлены в таблице 4 (значения *p* представлены с поправкой на множественное тестирование).

По результатам анализа статистически значимая разница в распределении генотипов

Таблица 4

Распределение частот генотипов вариантов генов *VDR* и *MTHFR* в группах с различным статусом витамина D

Ген, локус	Генотип	Частота генотипа (%) в группах			<i>p</i> _{FDR}	OR (95% ДИ)	<i>p</i> _{FDR}
		норма	недостаточность	дефицит			
<i>VDR</i> rs7975232	C/C	30,3	27,2	22,0	0,36	–	0,42
	A/C	40,9	45,2	48,1		1,2 (0,7; 1,9)	
	A/A	28,9	27,6	29,5		0,9 (0,5; 1,4)	
<i>VDR</i> rs1544410	C/C	28,9	31,3	33,4	0,05	–	0,018
	C/T	38,7	47,0	47,5		1,1 (0,7; 1,7)	
	T/T	32,4	21,7	19,1		0,6 (0,3; 0,9)	
<i>VDR</i> rs731236	A/A	26,8	27,6	36,6	0,015	–	0,015
	A/G	40,1	49,3	45,4		1,0 (0,6; 1,6)	
	G/G	33,1	23,1	18,0		0,5 (0,3; 0,9)	
<i>VDR</i> rs2228570	G/G	31,7	27,6	27,3	0,3	–	0,24
	G/A	48,6	47,0	44,8		1,4 (0,9; 2,1)	
	A/A	19,7	25,4	27,9		2,2 (0,5; 9,9)	

Окончание таблицы 4

Ген, локус	Генотип	Частота генотипа (%) в группах			P_{FDR}	OR (95% ДИ)	P_{FDR}
		норма	недостаточность	дефицит			
<i>VDR</i> rs11568820	G/G	73,2	65,9	66,7	0,35	–	0,25
	G/A	25,4	31,8	30,1		1,2 (0,7; 1,9)	
	A/A	1,4	2,3	3,3		1,2 (0,7; 1,9)	
<i>MTHFR</i> rs1801133	G/G	10,6	10,1	27,9	0,012	–	0,049
	G/A	37,2	50,0	31,7		1,5 (0,9; 2,4)	
	A/A	52,2	39,9	40,4		2,1 (1,1; 4,4)	

Примечание. Коэффициент отношения шансов (OR) рассчитан при сравнении группы «норма» с объединенными группами «недостаточность» + «дефицит»

между группами в зависимости от статуса витамина D была выявлена только для вариантов rs1544410, rs731236 и rs1801133. При этом стоит отметить, что в группе с дефицитом витамина D преимущественно встречались носители гомозиготных генотипов rs1544410 C/C и rs731236 A/A, в то время как в группе с нормальным статусом витамина D более распространены генотипы rs1544410 T/T и rs731236 G/G. Для носителей генотипа rs1801133 A/A, риск недостаточности/дефицита витамина D существенно выше по сравнению с носителями генотипа G/G (OR = 2,1; 95% ДИ 1,1–4,4, $P_{FDR} = 0,049$), в то время как для носителей генотипов rs1544410 T/T и rs731236 G/G он был снижен (OR = 0,6 и 0,5 соответственно, $p = 0,02$).

Высокий интерес к изучению метаболизма витамина D в последние годы объясняется его плеiotропным биологическим эффектом и вовлеченностью во многие физиологические и патологические процессы. В настоящем исследовании нами показана статистически значимая ассоциация вариантов генов с уровнем 25(OH)D в плазме: генотипы rs1544410 T/T и rs731236 G/G гена *VDR* связаны с повышенным уровнем витамина D в плазме, в то время как для носителей генотипов rs11568820 A/G + A/A характерен сниженный уровень. Комплексный анализ позволил выявить комбинацию аллелей, статистически значимо ассоциированную со сниженным уровнем витамина D в сыворотке.

Варианты rs7975232, rs1544410 и rs731236 локализованы на 3'-конце гена *VDR* и влияют на стабильность мРНК, в то время как вариант rs11568820 может изменять транскрипци-

онную активность промоторной области гена [23]. Можно предположить, что повышенный уровень циркулирующего 25(OH)D у носителей определенных генотипов может быть обусловлен изменениями в эффективности витаминного обмена вследствие изменения экспрессии рецептора витамина D. Это подтверждается тем, что уровень мРНК заметно снижен у носителей генотипа rs1544410 T/T по сравнению с носителями генотипа C/C [24]. У носителей rs7975232 C-, rs1544410 C- и rs731236 A-аллелей экспрессия рецептора повышена, что способствует улучшенному метаболизму витамина. Генные вариации могут приводить к снижению активности широкого спектра ферментов, участвующих в метаболизме 25(OH)D, способствуя повышению его уровня в плазме крови и одновременно снижению межклеточной концентрации 1,25-дигидроксивитамина D, что приводит к неблагоприятным последствиям для здоровья, которые вызваны гиповитаминозом, несмотря на высокое его содержание в крови [25]. Эта гипотеза требует подтверждения в дальнейших исследованиях.

Таким образом, нами выявлен ряд маркеров, статистически значимо ассоциированных со статусом витамина D. Выявленные значительные различия в уровне 25(OH)D в сыворотке у лиц с разными генотипами свидетельствует о том, что универсальный подход в ходе витаминной поддержки требует коррекции принимаемой дозы препаратов холекальциферола в зависимости от индивидуального генотипа пациента. Для более точной оценки связи изученных полиморфных вариантов с уровнем 25(OH)D необходимо учитывать дополнитель-

ные средовые факторы, включая диету, длительность пребывания на солнце, физическую активность и прочее.

Заключение

В исследовании получены новые данные в области генетики витамина D и персонализированной медицины. Полиморфные варианты rs1544410, rs731236, rs11568820 гена *VDR* и rs1801133 гена *MTHFR* могут играть важную роль при оценке риска дефицита витамина D и разработке индивидуальных рекомендаций по оптимизации витаминной поддержки, профилактике ряда социально значимых заболеваний.

Исследование выполнено в рамках задания 6.3 «Молекулярно-генетические аспекты костно-мышечной патологии» научно-технической программы Союзного государства «Разработка инновационных геногеографических и геномных технологий идентификации личности и индивидуальных особенностей человека на основе изучения генофондов регионов Союзного государства» («ДНК-идентификация»).

Список использованных источников

1. Vitamin D: Metabolism, Molecular Mechanism of Action, and Pleiotropic Effects / S. Christakos [et al.] // *Physiol. Reviews.* – 2016. – Vol. 96, iss.1. – P. 365–408.
2. Haussler, M. R. Vitamin D receptor (VDR)-mediated actions of $1\alpha, 25(\text{OH})_2$ vitamin D₃: genomic and non-genomic mechanisms / M. R. Haussler, P. W. Jurutka [et al.] // *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* – 2011. – Vol. 25. – № 4. – P. 543–559.
3. Arnson, Y. Vitamin D and autoimmunity: new aetiological and therapeutic considerations / Y. Arnson, H. Amital [et al.] // *Ann. Rheum. Dis.* – 2007. – Vol. 66. – № 9. – P. 1137–1142.
4. Pludowski, P. Vitamin D effects on musculoskeletal health, immunity, autoimmunity, cardiovascular disease, cancer, fertility, pregnancy, dementia and mortality – a review of recent evidence / P. Pludowski, M. F. Holick [et al.] // *Autoimmun Rev.* – 2013. – Vol. 12. – № 10. – P. 976–989.
5. Pludowski, P. Vitamin D supplementation guidelines / P. Pludowski, M. F. Holick [et al.] // *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* – 2018. – Vol. 175. – P. 125–135.
6. Miyamoto, K. Structural organization of the human vitamin D receptor chromosomal gene and its promoter / K. Miyamoto, R. A. Kesterson [et al.] // *Mol Endocrinol.* – 1997. – Vol. 11. – P. 1165–1179.
7. Jurutka, P. W. Molecular nature of the vitamin D receptor and its role in regulation of gene expression / P. W. Jurutka, G. K. Whitfield [et al.] // *Reviews in endocrine & metabolic disorders.* – 2001. – Vol. 2. – P. 203–216.
8. Gross, C. The vitamin D receptor gene start codon polymorphism: a functional analysis of FokI variants / C. Gross, A. V. Krishnan [et al.] // *Journal of bone and mineral research.* – 1998. – Vol. 13. – P. 1691–1699.
9. Yamamoto, H. The caudal-related homeodomain protein Cdx-2 regulates vitamin D receptor gene expression in the small intestine / H. Yamamoto, K. Miyamoto [et al.] // *Journal of bone and mineral research.* – 1999. – Vol. 14. – P. 240–247.
10. Yamada, K. Effects of common polymorphisms on the properties of recombinant human methylenetetra-hydrofolate reductase / K. Yamada, Z. Chen [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 2001. – Vol. 98. – P. 14853e8.
11. Kanis, J. A. European guidance for the diagnosis and management of osteoporosis in postmenopausal women / J. A. Kanis, N. Burlet [et al.] // *Osteoporosis international.* – 2008. – Vol. 19. – P. 399–428.
12. Holick, M. F. Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D deficiency: an Endocrine Society clinical practice guideline / M. F. Holick, N. C. Binkley [et al.] // *The Journal of clinical endocrinology and metabolism.* – 2011. – Vol. 96. – P. 1911–1930.
13. Marozik, P. Association of vitamin D receptor gene variation with osteoporosis risk in belarusian and lithuanian postmenopausal women / P. Marozik, M. Tamulaitiene [et al.] // *Front Endocrinol (Lausanne).* – 2018. – Vol. 9. – P. 305.
14. Marozik, P. Vitamin D status, bone mineral density, and *VDR* gene polymorphism in a cohort of Belarusian postmenopausal women / P. Marozik, A. Rudenka [et al.] // *Nutrients* 2021, 13, 837.
15. Physical status: the use and interpretation of anthropometry. Report of a WHO Expert Committee / *World Health Organ Tech Rep Ser* // 1995. – Vol. 854. – P. 1–452.

16. Vranić, L. Vitamin D Deficiency: Consequence or Cause of Obesity? / L. Vranić, I. Mikolašević [et al.] // *Medicina* (Kaunas, Lithuania). – 2019. – Vol. 55. – № 9 – P. 541.
17. Zhang, L. Associations between VDR Gene Polymorphisms and Osteoporosis Risk and Bone Mineral Density in Postmenopausal Women: A systematic review and Meta-Analysis / L. Zhang, X. Yin [et al.] // *Scientific reports*. – 2018. – Vol. 8. – P. 981.
18. Wang, S. The association between vitamin D receptor FokI gene polymorphism and osteoporosis in postmenopausal women: a meta-analysis / S. Wang, Z. Ai [et al.] // *Climacteric: the journal of the International Menopause Society*. – 2020. – Vol. 10. – P. 1–6.
19. Karczewski, K. J. The mutational constraint spectrum quantified from variation in 141, 456 humans / K. J. Karczewski, L. C. Francioli [et al.] // *Nature*. – 2020. – Vol. 581. – P. 434–443.
20. Marini, F. Study of vitamin D status and vitamin D receptor polymorphisms in a cohort of Italian patients with juvenile idiopathic arthritis / F. Marini, F. Falcini [et al.] // *Scientific reports*. – 2020. – Vol. 10. – P. 17550.
21. Barry, E. L. Genetic variants in CYP2R1, CYP24A1, and VDR modify the efficacy of vitamin D3 supplementation for increasing serum 25-hydroxyvitamin D levels in a randomized controlled trial / E. L. Barry, J. R. Rees [et al.] // *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. – 2014. – Vol. 99. – P. E2133–2137.
22. Amer, M. The relationship between 25-Hydroxyvitamin D and homocysteine in asymptomatic adults / M. Amer, R Qayyum // *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. – 2014. – Vol. 99. – Issue 2. – P. 633–638
23. Fang, Y. Promoter and 3'-untranslated-region haplotypes in the vitamin d receptor gene predispose to osteoporotic fracture: the rotterdam study / Y. Fang, J. B. van Meurs [et al.] // *American journal of human genetics*. – 2005. – Vol. 77. – P. 807–823.
24. Luo, X. Y. Vitamin D receptor gene BsmI polymorphism B allele, but not BB genotype, is associated with systemic lupus erythematosus in a Han Chinese population / X. Y. Luo, M. H. Yang, // *Lupus*. – 2012. – Vol. 21. – P. 53–59.
25. McGrath, J. J. A systematic review of the association between common single nucleotide polymorphisms and 25-hydroxyvitamin D concentrations / J. J. McGrath, S. Saha // *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. – 2010. – Vol. 121. – P. 471–477.

**E. V. Kobets¹, E. V. Rudenko², A. V. Rudenko³, V. Yu. Samokhovec³, T. G. Kapustsina⁴,
P. M. Marozik^{1,4}**

ANALYSIS OF AN ASSOCIATION OF POLYMORPHIC *VDR* AND *MTHFR* GENE VARIANTS WITH VITAMIN D STATUS IN BELARUSIAN WOMEN

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: P.Marozik@igc.by

²State Medical University

83 Dzerzhynsky Ave., 220072 Minsk, Republic of Belarus

³Belarusian Medical Academy of Post-Graduate Education

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

⁴International Sakharov Environmental Institute of the Belarusian State University

23/1 Dolgobrodskaya St., 220070 Minsk, Republic of Belarus

Vitamin D is important for bone health and is also involved in maintaining the immune system and cell proliferation. Vitamin D status is a major healthcare concern worldwide. Gene variants, involved in vitamin D metabolism, may be associated with vitamin D status and the effectiveness of vitamin D supplementation. The aim of this work was to analyze the association of *VDR* rs7975232, rs1544410, rs731236, rs2228570 and rs11568820, *MTHFR* rs1801133 gene variants with the 25(OH)D level in Belarusian women. In total, 602 individuals, meeting the inclusion criteria, were recruited into the study. The study results demonstrated an association of the rs1544410 T/T and rs731236 G/G variants with an increased 25(OH)D level, and rs11568820 A/G + A/A and rs1801133 A/A with a reduced 25(OH)D level. G-G-G allelic combination carriers had a significantly increased ($\beta = 3.5$; 95 CI 1.4-5.7, $p = 0.0015$) vitamin D level. The identified markers may play an important role in optimizing vitamin supplementation and preventing complex diseases.

Keywords: vitamin D deficiency, vitamin D status, genetic polymorphism, *VDR* gene, *MTHFR* gene.

Дата поступления в редакцию: 28 сентября 2021 г.

А. В. Колубако, Е. А. Николайчик

ТРАНСКРИПЦИОННЫЙ ФАКТОР WRKY65 УЧАСТВУЕТ В РЕГУЛЯЦИИ ИММУННОГО ОТВЕТА РАСТЕНИЙ КАРТОФЕЛЯ НА *PECTOBACTERIUM VERSATILE*

Белорусский государственный университет
Республика Беларусь, 220030, Минск, пр. Независимости, 4
e-mail: kolubakoav@yandex.by

В настоящей работе проанализированы паттерны экспрессии защитных генов растений культурного (*Solanum tuberosum*) и дикого (*S. bulbocastanum*) видов картофеля при снижении экспрессии гена транскрипционного фактора WRKY65 и в ответ на заражение различными штаммами *Pectobacterium versatile*. Сделано заключение о роли WRKY65 в модуляции гормонального статуса растений и фенотипических проявлений иммунного ответа.

Ключевые слова: *Solanum tuberosum*, *Solanum bulbocastanum*, транскрипционный фактор WRKY65, *Pectobacterium versatile*.

Введение

Pectobacterium versatile — некротрофный патоген растений семейства Пасленовые, вызывающий гнили различных тканей растений, что вредит продуктивности последних, а также снижает лежкость урожая при хранении. Вид был выделен недавно из группы *P. carotovorum* в результате анализа геномных последовательностей [1, 2]. Попадая в ткани хозяина, *P. versatile* секретирует ферменты, разрушающие клеточную стенку, что приводит к высвобождению определенного количества кальция, активации двухкомпонентной системы PhoPQ и синтезу полигалактуроназ, которые активны в слабокислой среде. Активность полигалактуроназ приводит к высвобождению еще больших количеств кальция на поздних этапах заражения, что приводит к репрессии сигнала PhoPQ и, как следствие, активации пектацтиаз, требующих высоких концентраций кальция и щелочной среды [3]. Таким образом, пектобактерии последовательно продуцируют различные гидролитические экзоферменты для последовательной деградации полимеров клеточной стенки растений (и соответствующие мембранные транспортеры) для максимальной утилизации источников энергии [4] при одновременной минимизации индукции защитных реакций растения-хозяина. Помимо гидролитических ферментов бактерии *P. versatile* для

колонизации растений вводят эффекторный белок DspE прямо в клетки хозяина при помощи системы секреции III типа (ССТТ) [5]. Для экспрессии всего аппарата ССТТ в клетках бактерий и, как следствие, доставки DspE в ткани растений, необходим альтернативный сигма-фактор HrpL [6, 7]. *P. versatile*, мутантные по генам *hrpL* и *dspE*, обладают намного более сниженной способностью вызывать симптомы реакции гиперчувствительности в тканях растений-хозяев [5, 8]. В клетках *N. benthamiana* эффекторный белок DspE распознается серинтреониновыми рецепторподобными киназами RLK2 и RLK5 [9], что приводит к запуску MAP-киназного сигнального каскада (активации киназ SIPK и WIPK) вследствие активации жасмонатного и репрессии салицилатного сигнального пути [10]. Такие события ведут к запуску эффектор-индуцированного иммунитета и реакции гиперчувствительности, изменению экспрессии защитных генов и некоторых рецепторов [5, 9, 11]. Это способствует колонизации растений, поскольку *P. versatile* — некротрофный патоген, а окислительному взрыву он успешно противостоит. В соответствующих условиях одного лишь DspE уже достаточно для индукции в растениях программируемой клеточной гибели [7].

Интересны компоненты иммунитета, активируемые в сигнальной цепи после рецепторов

и киназ — регуляторы ответа. Особым разнообразием отличаются транскрипционные факторы семейства WRKY. Это семейство многочисленно у растений, они являются конечными звеньями сигнальных цепей, контролирующими самые разнообразные процессы: от поддержания гомеостаза до ответа на стрессы абиотической и биотической природы. Многочисленность транскрипционных факторов этого семейства с учетом возможности модуляции экспрессии генов на разных уровнях и способностью к авто- и перекрестной регуляции дает широкие возможности для тонкой регуляции клеточных процессов [12].

Стоит отметить, что в растениях *N. benthamiana*, по сравнению с *S. tuberosum*, довольно много охарактеризованных компонентов сигнальных цепей иммунного ответа, в том числе членов семейства WRKY, поскольку в *N. benthamiana* достаточно просто индуцировать сайленсинг генов при помощи векторов на основе вирусов [13]. Охарактеризованных транскрипционных факторов WRKY в растениях картофеля довольно мало. Известно, что stWRKY1 положительно регулирует устойчивость к абиотическим и биотическим стрессам, в частности к засухе и заражению *Phytophthora infestans* [14]. Также устойчивость к фитофторозу обеспечивает stWRKY8, регулирующий биосинтез бензилизохинолиновых алкалоидов, проявляющих антимикробные свойства и укрепляющих клеточные стенки, что останавливает развитие заболевания [15]. Объемная работа по полногеномной идентификации роли транскрипционных факторов WRKY в ответе растений *S. tuberosum* на стрессы различной природы сконцентрирована в основном на абиотических стрессах и минимально затрагивает роль этих регуляторов в контроле иммунитета [16]. Роль большинства транскрипционных факторов семейства WRKY в растениях картофеля при развитии бактериозов остается неизвестной.

В процессе работы с литературными источниками и базой данных STRING [17] было выбрано 3 кандидата для экспериментального анализа: WRKY6, WRKY65 и WRKY71.

WRKY6 опосредованно связан с биосинтезом рибосом в растительной клетке, а также с WRKY33, для которого показано участие в сигнальной цепи клеток растений резухо-

видки Таля в ответ на внедрение патогена, что посредством передачи сигнала через MAP-киназный каскад и активации нескольких транскрипционных факторов вызывает синтез фитоалексина камалексина [18, 19].

WRKY71 в растении *Chimonanthus praecox* изменяет экспрессию в ответ на холод, жару, засуху, обработку абсцизовой кислотой, салициловой кислотой и метилжасмонатом [20]. Это дает возможность предположить, что он играет роль в глобальной регуляции ответа на стресс.

Транскрипционный фактор WRKY65 в растениях пионов *Paeonia lactiflora* отвечает за устойчивость растения к некротрофу *Alternaria tenuissima*. Показано, что WRKY65 при внедрении патогена модулирует сигнал жасмоновой и салициловой кислоты в растении и отвечает за индукцию экспрессии ряда PR-генов, тем самым повышая устойчивость к патогену [21]. Поскольку *P. versatilis* является некротрофным патогеном, механизм ответа сигнальных систем растений на патоген с таким способом питания может быть схож, что обуславливает целесообразность исследования роли WRKY65 в иммунном ответе растений семейства Пасленовые на патоген *P. versatilis*.

Материалы и методы

В эксперименте использовались растения *Solanum bulbocastanum*, выращенные при 20 °C и 16-часовом световом дне; клубни картофеля *Solanum tuberosum* сорта Рогнеда, которые хранились при температуре 2–7 °C в темноте. Штаммы пектобактерий *P. versatilis* JN42 (дикого типа), *P. versatilis* VKE (*dspE*-мутант JN42), а также агробактерий *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 культивировали на среде LB при 28 °C, а *E. coli* — при 37 °C.

Заражение клубней клетками бактериальных культур проводили следующим образом: для смыва клеток и разведения суспензии использовали NaCl 0,85 моль/л, этот же раствор использовали для уколов клубней в качестве контролей. Хорошие целые клубни промывали, просушивали, затем обрабатывали этиловым спиртом. После просыхания в клубни с помощью дозатора и наконечника вводили 10 мкл суспензии ($OD_{600} = 0,3$) бактерий *P. versatilis* JN42 и *P. versatilis* VKE или NaCl 0,85 моль/л в качестве контроля. Введение суспензии про-

водили, расположив клубень горизонтально, со стороны столона под углом 45° к поверхности стола. Затем места укола заматывали герметизирующей пленкой PARAFILM и в полиэтиленовых пакетах помещали в термостат (28 °С) на 2 дня. По истечении 48 ч производили отбор образцов тканей, граничащих с пораженными участками с последующим замораживанием при –80 °С.

Конструкция для сайленсинга гена транскрипционного фактора WRKY65 в растениях *S. bulbocastanum* была получена путем амплификации участка гена *WRKY65* размером 393 п. н. растений *S. bulbocastanum* с помощью праймеров gaggaattccatccwgggtccaaattgcctaa и ttgtcgcacagggatctacaaggattgcctc и клонирования по сайтам *EcoRI* и *XhoI* в вектор pTRV2. Проверка корректности конструкций производилась при помощи ПЦР и рестрикции. Иные конструкции, использованные для контроля индукции сайленсинга, а также характеристики штаммов бактерий указаны в [22]. Вирусиндуцированный сайленсинг осуществлялся по методике [23]. После трансформации растения помещались в климатическую камеру

с 16-часовым световым днем и температурой 16–18 °С на 2 дня, затем выставлялась температура 24 °С. Для инфильтрации растений *S. bulbocastanum* использованы суспензии клеток штаммов *P. versatilis* в концентрации $OD_{600} = 3$. Заражение растений и процедура учета результатов по 5-бальной шкале описаны в [10]. Оценка значимости различий в реакциях растений *S. bulbocastanum* на введение патогенов производилась при помощи критерия Краскела-Уоллиса в программе Statistica (версия 6.0.668.0). Для статистической обработки результатов заражения оценивали реакцию не менее 10 растений в каждой группе.

Методика ОТ-кПЦР описана в [6], последовательности олигонуклеотидов для измерения уровней экспрессии генов в растениях картофеля указаны в таблице 1. Измерение уровней экспрессии генов в растении *S. tuberosum* производилось относительно референсных генов *CAC*, *SAND* и *EF1a*, в растении *S. bulbocastanum* — относительно *CAC* и *TBP*. Подбор наиболее стабильно экспрессирующихся генов в растениях производился при помощи алгоритма geNorm.

Таблица 1

Последовательности олигонуклеотидов использованных в работе

Название гена	Продукт	Последовательности олигонуклеотидов
<i>WRKY65</i>	Транскрипционный фактор WRKY	gaggaattccatccwgggtccaaattgcctaa ttgtcgcacagggatctacaaggattgcctc
<i>EF-1af</i>	Фактор элонгации	ttgatgctcttgaccagattaacg acgggcacagttccaatacc
<i>CAC</i>	Компонент клатрин-адапторного комплекса	cctccgttgatgtaactgg attggtggaagtaacatcatcg
<i>TBP</i>	ТАТА-связывающий белок	ggagccaaaagtgaacaacag cgtaacttgagaaagcaccgt
<i>WRKY71</i>	Транскрипционный фактор WRKY	ggtgcacaagtcaaaagtcgag aagcagcagcagcatttct
<i>WRKY71.2</i>	Транскрипционный фактор WRKY	tgtccagcaactcttagggga ggccgcagaagtaatgaggag
<i>WRKY65</i>	Транскрипционный фактор WRKY	ccagccataatcatcctgtgctc tgggatttcagctttgtgt
<i>WRKY71.3</i>	Транскрипционный фактор WRKY	agaagcgtgtggagaggtca cattcttgaacgctaccgc

Окончание таблицы 1

Название гена	Продукт	Последовательности олигонуклеотидов
<i>WRKY6</i>	Транскрипционный фактор WRKY	aagggtgctgaggatcgga tcccatctgcacttgacatcg
<i>AAO3</i>	Оксидаза абсцизового альдегида	ctgattcgccaggcacaaca cactgacagcagcgccaaaag
<i>NCED3</i>	9-цис-эпоксикаротеноид диоксигеназа	tgtgaaccatggcscaaaagt accatcgtcttctctctgct
<i>CYP707A1</i>	Гидроксилаза АБК	ggcaatggggtcactcatgct gcccaccatagaccacctgta
<i>PR1a</i>	PR белок с неизвестной функцией	gggagaagccaaactacaactatg ttgcatgaaatgaaccacatcc
<i>PR2</i>	Эндоглюканаза	ctaatgctggtgtacaagatgg tgacacaacaattctacagatcc
<i>PR3</i>	Хитиназа	aataagccatcatgccacaacg gcagtattcggaccatccc
<i>PR5</i>	Осмотин	atttgagggtccataacaactgtcc gcaattagtagcaccscaaatcag
<i>PR6</i>	Ингибитор протеаз	gggaaagaatatgctcaagttatc aattctccatcatcttccactg
<i>TGA</i>	Транскрипционный фактор, связанный с салицилатной сигнализацией	gggtcatcaggagatgcagctta gcaatgtttgtgacgcaggt
<i>COI1q</i>	«Коронатин нечувствительный» белок	tggcgaagggtgccttgaa gtcagcscaaaaccagccgaaa
<i>F-box</i>	Белок, содержащий F-бок и LRR-домен, компонент E3- убиквитинлигазы	gacagtcagcagcacagga tctaagccagagcaaccccat
<i>JAZ</i>	Негативный регулятор жасмонат- зависимых генов	atcggaaccggaaaaggcac aaggtacttttgagtcagcct
<i>RLK2</i>	Рецепторподобная киназа	accgggtctttgtggttctcc ggactagcggatgttggtgac
<i>RLK5s</i>	Рецепторподобная киназа	tggaattgttggtgatctgtagt atatgaaccacatcaacagacct
<i>AP2</i>	Транскрипционный фактор ответа на этилен ERF6	gaagggtgtccgtgtttggc tagcaggtggtgatgggacg

Результаты и обсуждение

P. versatile подавляет экспрессию генов транскрипционных факторов семейства *WRKY*

С целью подбора наилучшего кандидата на

роль вероятного модулятора иммунного ответа из перечня генов транскрипционных факторов *WRKY* проведена оценка изменений уровней экспрессии этих генов у растений, зараженных бактериями *P. versatile* дикого типа и их *dspE*-

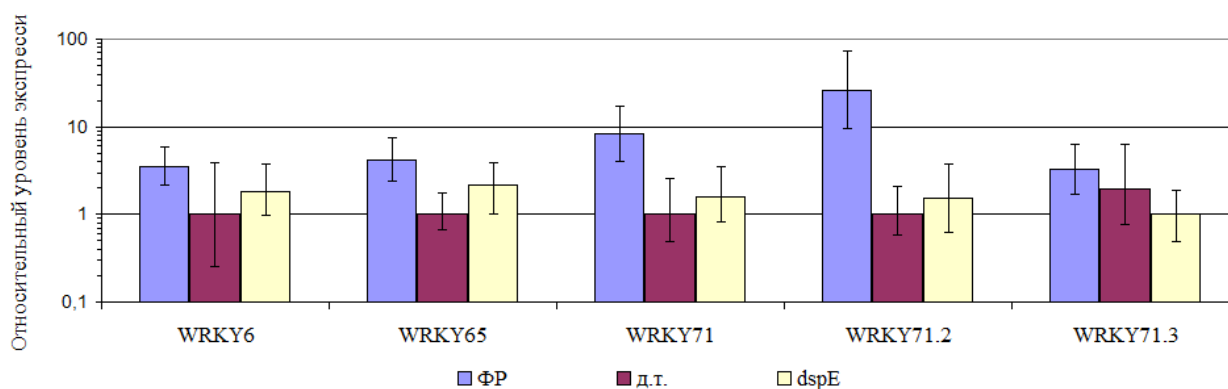


Рис. 1. Относительные уровни экспрессии генов *WRKY* в растениях *S. tuberosum* при инфильтрации 0,85% раствором NaCl (ФП), заражении *P. versatilis* JN42 (д. т.) и заражении *P. versatilis* VKE (*dspE*). Указаны средние значения с 95% доверительными интервалами

мутантами (рис. 1). Такая оценка показала способность патогена в разной степени подавлять экспрессию этих генов. Максимальная репрессия зафиксирована для гена *WRKY71.2*, однако наиболее интересным оказался ген транскрипционного фактора *WRKY65*, поскольку в ответ на заражение *P. versatilis* дикого типа его экспрессия падает в 5 раз по сравнению с растениями с индукцией раневого ответа (ФП), а отсутствие эффектора *DspE* частично снимает этот эффект, что могло свидетельствовать об участии *WRKY65* в сигнализации в ходе детекции патогена растением. На основании этого наблюдения была проведена инактивация гена *WRKY65* для более детального исследования его роли в сигнализации при детекции *P. versatilis*.

Сравнительный анализ иммунных реакций растений *S. tuberosum* и *S. bulbocastanum*

Растения *S. tuberosum* являются природным хозяином для используемого в настоящей работе штамма *P. versatilis*, однако тетраплоидный вид культурного картофеля неудобен для генетических манипуляций в целом и в частности устойчив к вирусу TRV, что делает его непригодным для вирус-индуцируемого сайленсинга генов (ВИСГ). С другой стороны, растения *S. bulbocastanum* подходят для инактивации генов с помощью ВИСГ [24], однако их реакции на заражение пектобактериями практически не исследованы. Поэтому для оценки пригодности *S. bulbocastanum* в качестве модельного объекта для генетических исследований иммунитета мы сравнили изменения уровней экспрессии ключевых генов, связанных с иммунным ответом генов с акцен-

том на *PR*-гены и компоненты основных гормональных сигнальных путей, контролирующих различные аспекты иммунных реакций.

Суспензии клеток штаммов дикого типа и *dspE*-мутанта были введены в клубни *S. tuberosum*, а также в листья *S. bulbocastanum*. Растения реагировали на введение суспензий патогена типично: прогрессирующим развитием мягкой гнили в клубнях и четко ограниченной зоной инфильтрации некрозом листьев, сходным с симптомами реакции сверхчувствительности (рис. 2). Через 1 или 2 суток после заражения уровни экспрессии генов ключевых компонентов иммунного ответа растений были измерены в образцах тканей клубней и листьев, граничащих с зонами поражения (рис. 3 и 4).

Для обоих видов характерна значительная (в 5–17 раз) репрессия генов *DspE*-специфичных рецепторподобных киназ *RLK2* и *RLK5*. Сходны также изменения числа транскриптов трех *PR*-генов: индукция *PR2* и *PR5*, репрессия *PR6*. Аналогично (снижая экспрессию при заражении) ведет себя и ген убиквитинлигазного компонента *F-box*. В клубнях *S. tuberosum* зафиксированы существенные изменения уровней экспрессии генов, связанных с метаболизмом абсцизовой кислоты: снижение (в 20–70 раз) для генов биосинтеза АБК *AAO3* и *NCED3* и активация (в 9 раз у *S. tuberosum*) для гена гидроксилазы АБК (*CYP707A1*). Менее выраженные, но той же направленности изменения экспрессии генов метаболизма АБК заметны и в листьях *S. bulbocastanum*. По активации репрессора жасмонатзависимых генов *JAZ3* и репрессии его ингибитора *COI1* очевидно ингибирование жасмонатного сигнального

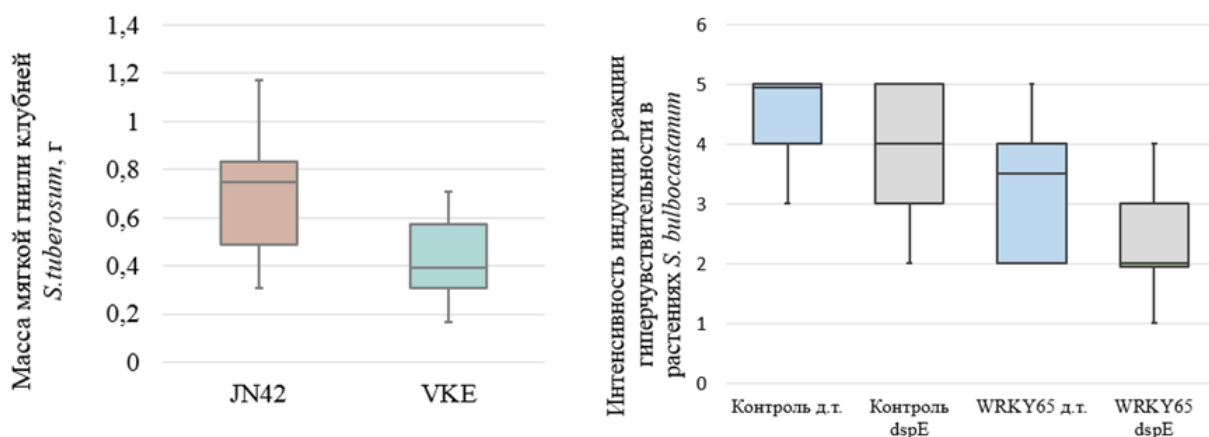


Рис. 2. Интенсивность поражения тканей в растениях *S. tuberosum* и *S. bulbocastanum* с сайленсингом гена *WRKY65*, инфицированных суспензиями штаммов *P. versatilis* JN42 (дикого типа) и VKE (*dspE*) в сравнении с контрольными растениями (pTRV2::GFP)

Представлены медианы с квартилями («ящик»), максимальные и минимальные значения («усы»). Отличия в реакции групп растений *S. tuberosum*, зараженных разными штаммами *P. versatilis* составляют $p = 0,001299$.

Отличия групп *S. bulbocastanum* с сайленсингом гена *WRKY65* от контрольных в случае заражения *P. versatilis* JN42 ($p = 0,0018$), *P. versatilis* VKE ($p = 0,0248$).

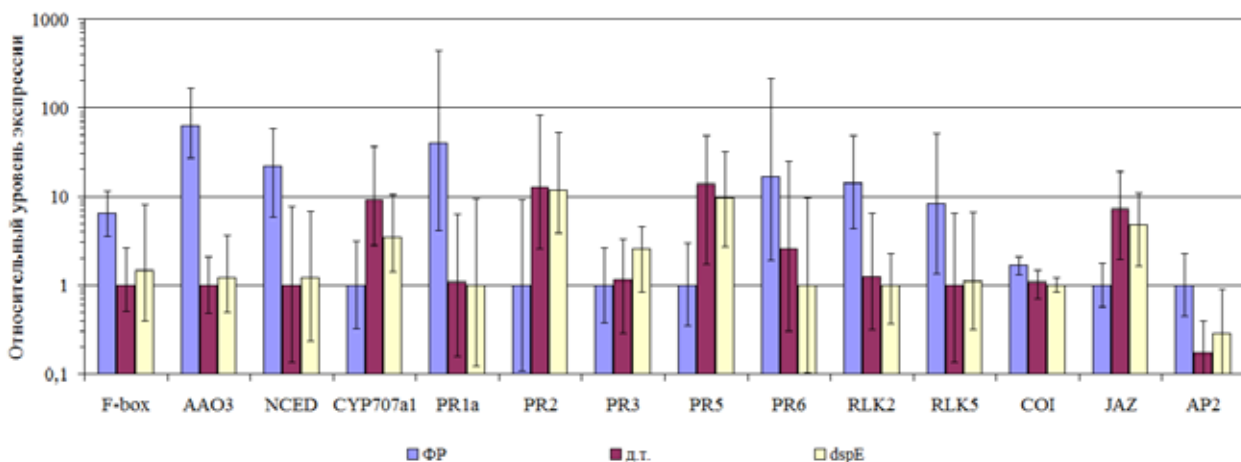


Рис. 3. Относительные уровни экспрессии генов иммунного ответа в растениях *S. tuberosum* при инфильтрации 0,85% раствором NaCl (ФР), заражении *P. versatilis* JN42 (д. т.) и заражении *P. versatilis* VKE (*dspE*). Указаны средние значения с 95% доверительными интервалами

пути в клубнях *S. tuberosum*, однако в листьях *S. bulbocastanum* зафиксированные отличия не выходят за пределы доверительных интервалов. Противоположная ситуация наблюдается у двух видов для маркеров салицилатного сигнального пути *SABP2*, *TGA* и *PR1*: индукция в листьях *S. bulbocastanum*, но репрессия в клубнях *S. tuberosum*. Таким образом, реакция растений двух видов картофеля на контакт с *P. versatilis* имела в целом сходный характер, поэтому *S. bulbocastanum* можно использовать для генетических исследований иммунных

реакций, актуальных и для *S. tuberosum* (за исключением салицилатной сигнализации). Следует отметить, что в этих экспериментах не выявлены различия в реакции растений на два разных бактериальных штамма (дикого типа и *dspE*-мутанта), что, скорее всего, связано с высокими инокулирующими дозами патогена.

Геном S. bulbocastanum содержит ортолог гена WRKY65

Из-за недоступности полной геномной последовательности о наличии в геноме

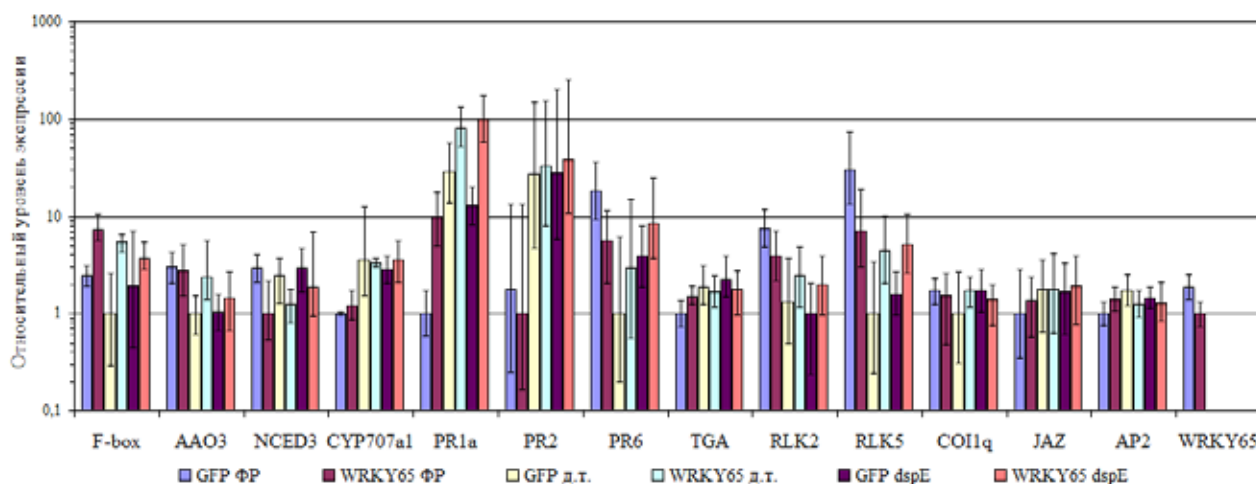


Рис. 4. Относительные уровни экспрессии генов в контрольных растениях *S. bulbocastanum* и растениях с сайленсингом гена *WRKY65*, инфильтрованных NaCl 0,8% (ФП), а также суспензиями клеток штаммов *P. versatile* JN42 (д. т.) и *P. versatile* VKE (*dspE* — мутант). Указаны средние значения с 95% доверительным интервалом

S. bulbocastanum ортолога гена *WRKY65* не было известно, поэтому мы попробовали амплифицировать и клонировать фрагмент соответствующей мРНК. Сравнение нуклеотидной последовательности фрагмента клонированной рамки считывания *WRKY65* с ортологичным геном (*XM_015309496.1*) референсного генома картофеля *S. tuberosum* (рис. 5) показало наличие делеции 6 нуклеотидов, а также 8 транзиций и 1 трансверсии, причем только 3 замены из 9 приводят к заменам аминокислотных остатков, причем только 1 из них неконсервативная (Glu–Lys). В целом выявленный уровень сходства двух последовательностей говорит о том, что клонирован фрагмент ортолога гена *XM_015309496.1* (далее ген обозначен как *sbWRKY65*). С этим фрагментом была создана плазмидная конструкция на ба-

зе вектора pTRV2 и осуществлен ВИСГ гена *sbWRKY65*.

Сайленсинг WRKY65 ослабляет реакцию сверхчувствительности, меняет уровни экспрессии генов рецепторных киназ, биосинтеза АБК и PR1

Фенотипический контроль за развитием ВИСГ в растениях *S. bulbocastanum* проводился визуально по интенсивности развития известных симптомов сайленсинга маркерных генов *SGT1* (фенотип сайленсинга в растениях *S. bulbocastanum* — их гибель) и *PDS* (фенотип сайленсинга — белые листья). Во время максимального развития симптомов ВИСГ через 42 дня после индукции сайленсинга растения были инфильтрованы суспензиями клеток бактериальных культур *P. versatile* дикого типа и *dspE*-мутанта. У подвергнутых сайленсингу

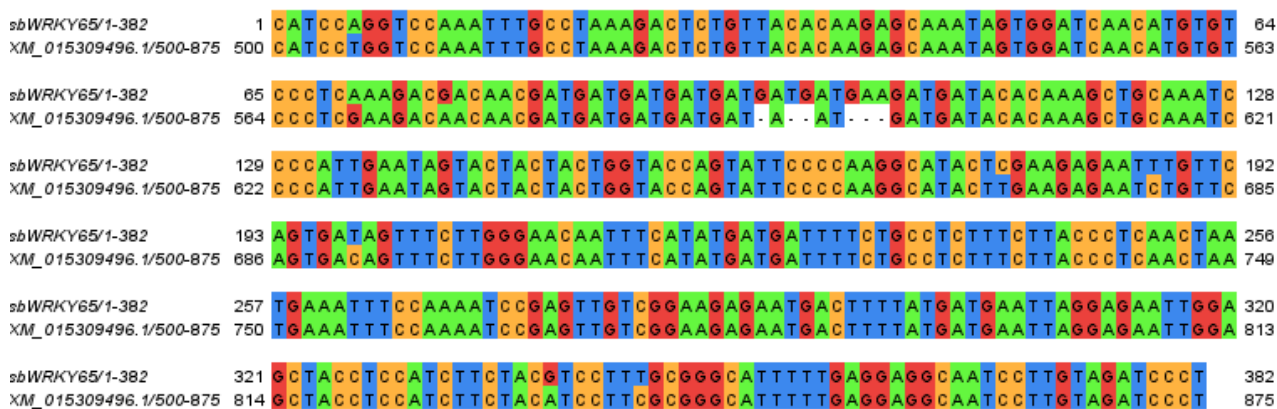


Рис. 5. Выравнивание участка гена *sbWRKY65* *S. bulbocastanum* относительно гомологичного гена *S. tuberosum* (*XM_015309496.1*)

растений интенсивность реакции сверхчувствительности была ослаблена, причем такая разница четче проявлялась при использовании суспензий мутантных бактерий (рис. 2).

Экспрессия гена *sbWRKY65* в образцах с сайленсингом уменьшилась в среднем на 50% по сравнению с контрольными (рис. 4). ВИСГ обычно приводит к более существенному снижению экспрессии генов-мишеней, однако наличие обратной связи у компонентов сигнальных цепочек может компенсировать эффекты сайленсинга. Такой компенсаторный эффект мы ранее наблюдали для генов рецепторподобных киназ, что, однако, не помешало исследовать их роль в распознавании патогена [9]. В настоящей работе также зафиксирована зависимость от *sbWRKY65* уровней экспрессии генов нескольких участников иммунного ответа (рис. 4). Сайленсинг *sbWRKY65* выровнял уровни экспрессии генов рецепторных киназ и *PR6*, уменьшив или полностью нивелировав разницу уровней их экспрессии у контрольных и зараженных *P. versatile* растений, что может свидетельствовать об участии *sbWRKY65* в сигнальной цепочке, ответственной за репрессию *RLK2*, *RLK5* и *PR6* в ходе пектобактериальной инфекции. По-другому сайленсинг *sbWRKY65* влияет на экспрессию еще двух генов: как у контрольных, так и у зараженных *P. versatile* растений происходит усиление экспрессии генов *PR1* и *F-box*. Повышение уровня экспрессии *PR1* в результате сайленсинга *sbWRKY65* коррелирует со слабо выраженным повышением экспрессии салицилатзависимого транскрипционного фактора TGA, однако такой эффект заметен только у контрольных растений. Сайленсинг *sbWRKY65* снизил уровень экспрессии гена *NCED3* как у контрольных, так и у зараженных штаммом дикого типа растений. Экспрессия *AAO3* у контрольных растений не менялась, но возросла у зараженных, т.е. сайленсинг *sbWRKY65* снимает вызываемое пектобактериями ингибирование этого гена. Таким образом, роль *sbWRKY65* в АБК-зависимой регуляции несомненна, но итоговый конечный эффект зависит и от других сигнальных систем.

Сайленсинг *sbWRKY65* не оказал существенного эффекта на экспрессию маркерных генов жасмонатного и этиленового сигнальных путей *JAZ3*, *CO11* и *AP2*.

Заключение

На заражение патогеном *P. versatile* растения двух видов картофеля отвечают снижением экспрессии генов рецепторподобных киназ, активацией салицилатной сигнализации, подавлением жасмонатного и АБК-зависимого сигнальных путей, следствием чего является индукция реакции гиперчувствительности в зоне контакта с патогеном, причем эффектор системы секреции третьего типа DspE *P. versatile* усиливал визуальные проявления иммунного ответа.

Транскрипционный фактор *WRKY65* в растениях *S. bulbocastanum* отвечает за ингибирование салицилатзависимого сигнального пути и существенно влияет на работу АБК-зависимого сигнального пути, что позволяет патогену подавлять экспрессию *Pectobacterium*-специфичных рецепторных киназ. В итоге при взаимодействии с *P. versatile* *WRKY65* облегчает заражение растения некротрофным патогеном, для которого погибшие клетки растений являются хорошей питательной средой. Создание растений со сниженной экспрессией этого транскрипционного фактора может повысить их устойчивость к актуальным бактериозам.

Выявленная в настоящей работе потенциальная взаимосвязь двух гормональных сигнальных путей растений картофеля, а также детали салицилат- и АБК-зависимой регуляции экспрессии генов рецепторных киназ заслуживают более детального исследования.

Список использованных источников

1. Elevation of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *odoriferum* to species level as *Pectobacterium odoriferum* sp. nov., proposal of *Pectobacterium brasiliense* sp. nov. and *Pectobacterium actinidiae* sp. nov., emended description of *Pectobacterium carotovorum* and description of *Pectobacterium versatile* sp. nov., isolated from streams and symptoms on diverse plants / P. Portier [et al.] // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2019. – Vol. 69, № 10. – P. 3207–3216.
2. Draft Genome Sequences of New Genomespecies “Candidatus *Pectobacterium maceratum*” Strains, Which Cause Soft Rot in Plants / F. V. Shirshikov [et al.] // Genome Announc. – 2018. – Vol. 6, № 15. – P. e00260-18.
3. The PhoPQ Two-Component System Is

- the Major Regulator of Cell Surface Properties, Stress Responses and Plant-Derived Substrate Utilisation During Development of *Pectobacterium versatile* — Host Plant Pathosystems / U. Kravchenko [et al.] // Front. Microbiol. — 2020. — Vol. 11 — P. 621391.
4. Reverchon, S. Chapter Three — Virulence Program of a Bacterial Plant Pathogen: The Dickeya Model / S. Reverchon, G. Muskhelishvili, W. Nasser // Progress in Molecular Biology and Translational Science: Host-Microbe Interactions / eds. M. San Francisco, B. San Francisco. — Academic Press, 2016. — Vol. 142. — Chapter Three — Virulence Program of a Bacterial Plant Pathogen. — P. 51–92.
5. Транслокация белка DspE фитопатогенными бактериями *Erwinia carotovora* subsp. atroseptica в клетки *Nicotiana tabacum* и его необходимость для индукции реакции гиперчувствительности / Е. А. Николайчик [и др.] // Доклады НАН Беларуси. — 2005. — Т. 49, № 5. — С. 81–85.
6. Николайчик, Е. А. Фитопатоген *Pectobacterium carotovorum* использует аппарат секреции III типа для блокирования системного защитного ответа растения-хозяина / Е. А. Николайчик, Л. Л. Хомская, Е. И. Игнатенко // Труды Белорусского Государственного Университета. — 2009. — № 4. — С. 189–196.
7. The Type III Secreted Effector DspE Is Required Early in *Solanum tuberosum* Leaf Infection by *Pectobacterium carotovorum* to Cause Cell Death, and Requires Wx(3–6)D/E Motifs / C.S. Hogan [et al.] // PLOS ONE. — 2013. — Vol. 8, № 6. — P. e65534.
8. *Pectobacterium carotovorum* Elicits Plant Cell Death with DspE/F but the *P. carotovorum* DspE Does Not Suppress Callose or Induce Expression of Plant Genes Early in Plant–Microbe Interactions / H.-S. Kim [et al.] // Mol. Plant–Microbe Interactions®. — 2011. — Vol. 24, № 7. — P. 773–786.
9. Бадалян, О. А. Рецепторподобные киназы RLK2 и RLK5 *Nicotiana benthamiana* участвуют в регуляции экспрессии генов ключевых компонентов иммунной системы растения при контакте с *Pectobacterium carotovorum* / О. А. Бадалян, Е. А. Николайчик // Известия Национальной Академии Наук Беларуси. — 2014. — Т. 4 — С. 75–80.
10. Бадалян, О. А. Участие MAP-киназ WIPK и SIPK растений *Nicotiana benthamiana* в детекции фитопатогена *Pectobacterium carotovorum* / О. А. Бадалян, Е. А. Николайчик // Доклады НАН Беларуси. — 2013. — Т. 57, № 6. — С. 75–81.
11. Radojčić, A. Salicylic Acid: A Double-Edged Sword for Programed Cell Death in Plants / A. Radojčić, X. Li, Y. Zhang // Front. Plant Sci. — 2018. — Vol. 9 — P. 1133.
12. Phukan, U. J. WRKY Transcription Factors: Molecular Regulation and Stress Responses in Plants / U. J. Phukan, G. S. Jeena, R. K. Shukla // Front. Plant Sci. — 2016. — Vol. 7 — P. 760.
13. Can WRKY transcription factors help plants to overcome environmental challenges? / T. Finatto [et al.] // Genet. Mol. Biol. — 2018. — Vol. 41, № 3. — P. 533–544.
14. Overexpression of potato transcription factor (StWRKY1) conferred resistance to *Phytophthora infestans* and improved tolerance to water stress / R. Shahzad [et al.] // Plant Omics. — 2016. — Vol. 9, № 2. — P. 149–158.
15. StWRKY8 transcription factor regulates benzyloisoquinoline alkaloid pathway in potato conferring resistance to late blight / K. N. Yogendra [et al.] // Plant Sci. — 2017. — Vol. 256 — P. 208–216.
16. Genome-wide identification of the potato WRKY transcription factor family / C. Zhang [et al.] // PLOS ONE. — 2017. — Vol. 12, № 7. — P. e0181573.
17. The STRING database in 2021: customizable protein–protein networks, and functional characterization of user-uploaded gene/measurement sets / D. Szklarczyk [et al.] // Nucleic Acids Res. — 2020. — Vol. 49, № D1. — P. D605–D612.
18. Phosphorylation of a WRKY transcription factor by two pathogen-responsive MAPKs drives phytoalexin biosynthesis in *Arabidopsis* / G. Mao [et al.] // Plant Cell. — 2011. — Vol. 23, № 4. — P. 1639–1653.
19. PRR2, a pseudo-response regulator, promotes salicylic acid and camalexin accumulation during plant immunity / C. Cheval [et al.] // Sci. Rep. — 2017. — Vol. 7, № 1. — P. 6979.
20. CpWRKY71, a WRKY Transcription Factor Gene of Wintersweet (*Chimonanthus praecox*), Promotes Flowering and Leaf Senescence in *Arabidopsis* / R. Huang [et al.] // Int. J. Mol. Sci. — 2019. — Vol. 20, № 21. — P. 5325.
21. The WRKY transcription factor Pl-

WRKY65 enhances the resistance of *Paeonia lactiflora* (herbaceous peony) to *Alternaria tenuissima* / X. Wang [et al.] // *Hortic. Res.* – 2020. – Vol. 7, № 1. – P. 1–12.

22. Колубако, А. В. Роль NDR1 в реакции растений *Nicotiana benthamiana* на заражение бактериями *Pectobacterium carotovorum* / А. В. Колубако, Е. А. Николайчик // *Молекулярная и прикладная генетика.* – 2017. – Т. 23 – С. 60–66.

23. Liu, Y. Virus-induced gene silencing in to-

mato / Y. Liu, M. Schiff, S. P. Dinesh-Kumar // *Plant J. Cell Mol. Biol.* – 2002. – Vol. 31, № 6. – P. 777–786.

24. Колубако, А. В. Использование *Solanum bulbocastanum* для моделирования взаимодействий между патогеном *Pectobacterium carotovorum* и растением-хозяином / А. В. Колубако, О. А. Бадалян, Е. А. Николайчик // *Известия Национальной Академии Наук Беларуси Серия Биологических Наук.* – 2016. – № 2. – С. 95–100.

N. V. Kalubaka, Y. A. Nikolaichik

TRANSCRIPTION FACTOR WRKY65 PARTICIPATES IN THE REGULATION OF A POTATO PLANT IMMUNE RESPONSE TO *PECTOBACTERIUM VERSATILE*

Belarusian State University
4 Nezavisimosty Ave., 220030 Minsk, Republic of Belarus
e-mail: kolubakoav@yandex.by

In this work, we have measured and analyzed the expression patterns of defence genes in two species of potato plants upon decreasing the expression of the WRKY65 transcription factor gene and in response to the infection with various strains of *Pectobacterium versatile*. A conclusion was made about the role of WRKY65 in modulating the hormonal status of plants and phenotypic manifestations of an immune response.

Keywords: *Solanum tuberosum*, *Solanum bulbocastanum*, transcription factor WRKY65, *Pectobacterium versatile*.

Дата поступления в редакцию: 03 сентября 2021 г.

А. И. Левданская, А. С. Светлова, Н. П. Максимова, Е. Г. Веремеенко

ЭКСПРЕССИЯ ФЕНАЗИНОВОГО ОПЕРОНА У ШТАММОВ *PSEUDOMONAS CHLORORAPHIS* SUBSP. *AURANTIACA* В-162, СПОСОБНЫХ К СВЕРХСИНТЕЗУ ФЕНАЗИНОВЫХ СОЕДИНЕНИЙ

Белорусский государственный университет
Республика Беларусь, 220030, г. Минск, пр-т. Независимости, 4
e-mail: tassigo@gmail.com

Для бактерии *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca* В-162 (дикий тип) и двух мутантных штаммов В-162/255 и В-162/17, способных к сверхпродукции феназинов, была проведена количественная оценка экспрессии генов *phz*-оперона при культивировании бактерий на полноценной (ПСА) и минимальной (М9) питательных средах в разные фазы роста культуры. Было показано, что для *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* наиболее оптимальными референсными генами являются гены, кодирующие пирролин-5-карбоксилат редуктазу (*p5cr*) и субъединицу А ДНК-гиразы (*gyrA*). Для штаммов В-162/255 и В-162/17 зарегистрирована обратная связь между уровнями экспрессии генов *phzA* и *phzB*. Паттерн экспрессии генов *phzC* и *phzD* штамма В-162/17, выращенного на среде М9, заметно отличается от такового у остальных исследуемых штаммов на обеих питательных средах. Для всех исследованных штаммов установлена четкая взаимосвязь между профилем экспрессии *phzE*-генов и питательной средой. ПЦР-продукты генов *phzF* и *phzG* у штамма В-162/255 зафиксированы с 12 до 18 ч культивирования, у штамма В-162/17 — только на 4–6 сут, хотя для штамма В-162 экспрессия данных генов в исследуемых временных точках не обнаружена.

Ключевые слова: феназиновый оперон, экспрессия генов, *Pseudomonas*, феназины.

Введение

Бактерии рода *Pseudomonas* синтезируют широкий спектр биологически активных метаболитов. Одним из наиболее интересных вторичных метаболитов *Pseudomonas* являются феназины — большая группа азотсодержащих гетероциклических соединений, различающихся по химическим и физическим свойствам [1]. Разнообразие характеристик и свойств данных соединений способствует их применению в промышленности, сельском хозяйстве и медицине [2, 3]. Образование феназинов происходит в ходе реакций шикиматного метаболического пути. Кроме феназиновых соединений в процессе реакций синтеза шикимовой кислоты образуются ароматические аминокислоты, такие как фенилаланин, тирозин и триптофан, а так же сидерофоры (железо-транспортирующие белки) и хиноны [1, 4].

Детальная расшифровка биосинтетическо-

го пути синтеза феназинов стала возможна, когда были секвенированы гены, кодирующие белки, участвующие в этом процессе у бактерий штаммов *Pseudomonas aureofaciens* и *Pseudomonas fluorescens* [4]. Это позволило обнаружить оперон с семью генами, *phzABCDEFG*, ответственный за образование основного феназинового соединения — феназин-1-карбоксилата (рис. 1). Последующие модификации феназин-1-карбоксилата дают все разнообразие известных на сегодняшний день феназиновых соединений. У обоих микроорганизмов *phz*-оперон присутствовал в двух копиях, каждая из которых была активна. Более поздние эксперименты продемонстрировали присутствие *phz*-оперонов и у многих других бактерий рода *Pseudomonas*, а также *Brevibacterium*, *Erwinia*, *Burkholderia* и др [1].

Установлено, что для синтеза феназин-1-



Рис. 1. Схема организации феназинового (*phz*-) оперона

карбоксилата требуются продукты шести генов — *phzA/B*, *phzD*, *phzE*, *phzF*, и *phzG*. Причем гены *phzA* и *phzB* представляют собой результат дупликации (сходство последовательностей на 80%) и последующей конвергенции, благодаря появлению двух мутаций в участке гена, кодирующем активный центр фермента. Ген *phzC* кодирует один из ключевых ферментов шикиматного пути — 3-дезоксид-арабиногептулозонат-7-фосфат-синтазу (ДАГФ-синтазу), которая катализирует первую реакцию этого пути: взаимодействие фосфоенолпирувата и эритрозо-4-фосфата [5]. В состав феназинового оперона также входят

дополнительные гены, вовлеченные в его регуляцию на уровне транскрипции (*phzI* и *phzR*). Ген, ответственный за модификацию феназин-1-карбоксильной кислоты (*phzH*), как правило, располагается за пределами оперона, но составляет с ним общий регулон [6].

В геноме бактерии *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* В-162 была обнаружена только одна копия *phz*-оперона [7]. На основе данного штамма путем химического мутагенеза на кафедре генетики БГУ были получены мутантные штаммы (рис. 2), способные к сверхсинтезу феназинов [8, 9].

Уровень продукции феназинов у штамма

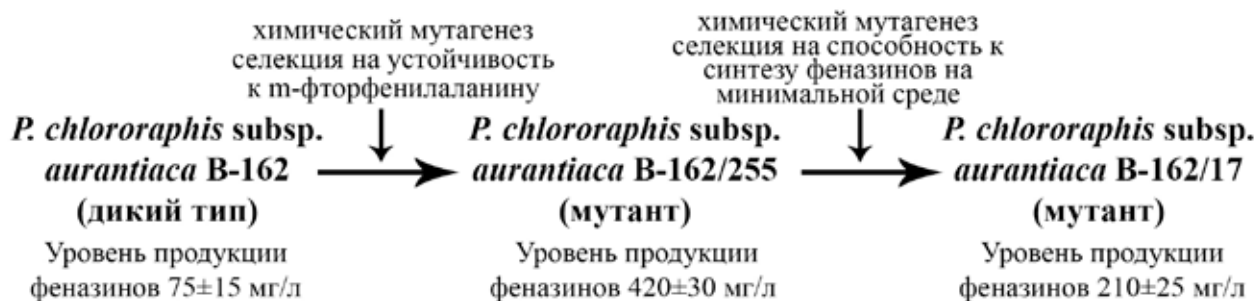


Рис. 2. Схема мутагенеза для получения исследуемых штаммов

В-162/255 на продукционной среде для антибиотиков (ПСА) составлял около 420 ± 30 мг/л, в то время как у полученного из него мутанта В-162/17 уровень продукции феназинов составлял 210 ± 25 мг/л. Однако характерной особенностью последнего штамма является приобретенная им в результате мутагенеза способность синтезировать феназиновые соединения на минимальной среде (М9) на том же уровне, что и на ПСА [8, 9]. Следует отметить, что бактерии рода *Pseudomonas*, ранее описанные в литературе, вообще не способны синтезировать феназины на минимальных средах.

В ходе сравнительного анализа геномов данных бактерий не было обнаружено мутаций в нуклеотидных последовательностях их феназиновых оперонов. Было сделано предположение, что разный уровень продукции феназинов у исследуемых мутантных штаммов *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca*, может быть обусловлен изменениями в механизмах экспрессии *phz*-оперона на разных стадиях роста бактерий на полноценной и минимальной средах.

Материалы и методы

В исследовании использовались бактерии *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* В-162 дикого типа из коллекции кафедры генетики, а также мутанты, полученные на его основе: *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* В-162/255 и *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* В-162/17. Бактерии культивировали при 28 °С.

Концентрацию бактерий, выращенных в жидких средах, определяли с помощью спектрофотометра Cary60 (Agilent Technologies, США) при длине волны 600 нм. Одинаковое количество клеток инокулировали в 2 мл среды М9 и ПСА для получения культуры в *log*-фазе роста.

Для остановки биосинтетических процессов в клетках перед выделением РНК к ним добавляли 400 мкл смеси фенол:этанол (1:20), после чего производили инкубацию на льду в течение 30 мин. Клетки осаждали 2 мин при 10 000 об/мин и к полученному осадку добавляли ExtractRNA Reagent (Евроген, Россия). Выделение тотальной РНК проводили согласно протоколу фирмы Евроген. Примеси ДНК удаляли с помощью DNaseI (New England

BioLabs, Великобритания).

Разбавленную в 100 раз РНК измеряли на спектрофотометре Cary60 (Agilent Technologies, США) при длинах волн 260, 280 и 320 нм. Концентрацию РНК определяли по формуле: $(\lambda_{260} - \lambda_{320}) \times 100 \times 40$. Оценку чистоты РНК производили по формуле: $\lambda_{260}/\lambda_{280}$ [10]. Полученные результаты по оценке чистоты входили в диапазон 1,8–2,0, что свидетельствовало о пригодности полученного препарата РНК для проведения дальнейших манипуляций.

Обратную транскрипцию проводили с помощью обратной транскриптазы ProtoScript II (New England BioLabs, Великобритания). Для

реакции использовался 1 мкг РНК.

Количественную ПЦР проводили на амплификаторе Bio-Rad CFX96 (Bio-Rad, США) с помощью реагента ArtMixColor (АртБиоТех, Беларусь). Для реакции в качестве матрицы на 20 мкл смеси использовали по 2 мкл разбавленной в пять раз кДНК, полученной в результате обратной транскрипции. В таблице 1 представлены праймеры, которые были использованы в исследованиях. Температура отжига всех праймеров составляла 50 °С. Остальные температуры для проведения количественной ПЦР и длительность инкубаций устанавливались в соответствии с протоколом, предложенным фирмой АртБиоТех.

Таблица 1

Последовательности праймеров, используемых в количественной ПЦР

Мишень	Последовательности праймеров	Ожидаемый размер фрагмента, п. о.
<i>rpoD</i>	rpoD-F: TCTGGTGATCTCCATCGC rpoD-R: CGAGAATTTGTAGCCGCG	130
<i>p5cr</i>	p5cr-F: AGGCGCAAGAACTGCTGT p5cr-R: TCATGGCTTCGATCAGCAG	126
<i>gyrA</i>	gyrA-F: TAGAGGTTGTTGAGGATCAC gyrA-R: GAGCTGGTCAAGGAGAAG	128
<i>16S</i>	16S-F: AGAAAGCAGGGGACCTTC 16S-R: CCGTGTCTCAGTTCAGT	140
<i>phzA</i>	phzA-F: GCTTCGCTTTCCCCTAGC phzA-R: GTTTCGGTGTTCAGGAACC	158
<i>phzB</i>	phzB-F: AACCACTTCCTGCACTCCTTC phzB-R: TAAGTTGGAATGCCCTTCGCG	134
<i>phzC</i>	phzC-F: GTCAGCGAGTGCGCTTC phzC-R: AAGGGTTGAGGTGGGCTG	140
<i>phzD</i>	phzD-F: TGCTGGAACGCATGCGTG phzD-R: TCCTTGCTGAAGTCGGCGAT	154
<i>phzE</i>	phzE-F: CCATCAGGTGCTGAGCTTG phzE-R: CCAGGCGGTCACTCG	152
<i>phzF</i>	phzF-F: AGCTTCCACGACATGGCCA phzF-R: ATCGCCAAGGGCCCG	129
<i>phzG</i>	phzG-F: AACGCCGCCAGGGAAC phzG-R: GTCATAGCGCAAGCGTTCATG	139

Результаты количественной ПЦР визуализировали с помощью программы Bio-Rad CFX Manager 3.1. Выбор референсных генов для определения экспрессии феназинового

оперона производили с помощью программы geNorm (<https://genorm.cmgg.be>). Эффективность амплификации определяли при помощи программы LinReg PCR v.2017.1. Далее

относительная экспрессия определялась по формуле Пфаффла;

$$RE = \frac{E_x^{C_x}}{E_R^{C_R}}$$

где RE — относительная экспрессия стыка А по отношению к стыку В;

E_x и E_R — эффективность амплификации для образцов целевого и референсного гена;

C_x и C_R — значения пороговых циклов для образцов целевого и референсного гена.

Результаты и обсуждение

Для определения уровня экспрессии структурных генов феназинового оперона необходимо было подобрать референсные гены, относительно которых проводилась оценка экспрессии целевых генов. Основываясь на работах [11, 12], нами были выбраны 4 гена-кандидата, стабильность экспрессии которых далее анализировались: ген, кодирующий σ -фактор РНК-полимеразы RpoD; ген, кодирующий пирролин-5-карбоксилат редуктазу (КФ 1.5.1.2); ген, кодирующий субъединицу А ДНК-гиразы (ЕС 5.99.1.3) и ген, кодирую-

щий 16S рРНК. Подобранные к последовательностям этих генов праймеры обозначены как rpoD, p5cr, gyrA 16S соответственно. Последовательности праймеров представлены в таблице 1.

Для сравнения стабильности экспрессии выбранных референсных генов в качестве матрицы использовали кДНК, полученные на основе РНК бактерий *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* В-162, В-162/255 и В-162/17 на различных стадиях роста на средах ПСА и М9. Полученные в ходе обсчета результатов экспериментов значения C_q обрабатывались программой geNorm. Для каждого из референсных генов определялся индекс стабильности экспрессии «М».

Как видно из рисунка 3 данный показатель по всем исследуемым генам попадает в диапазон от 0,5 до 1,5, что говорит о том, что экспрессия всех исследуемых генов достаточно стабильна [13]. Однако для дальнейших исследований были выбраны гены кодирующие пирролин-5-карбоксилат редуктазу (*p5cr*) и субъединицу А ДНК-гиразы (*gyrA*), как демонстрирующие наименьший показатель М, а следовательно, наиболее стабильно экспрессируемые.

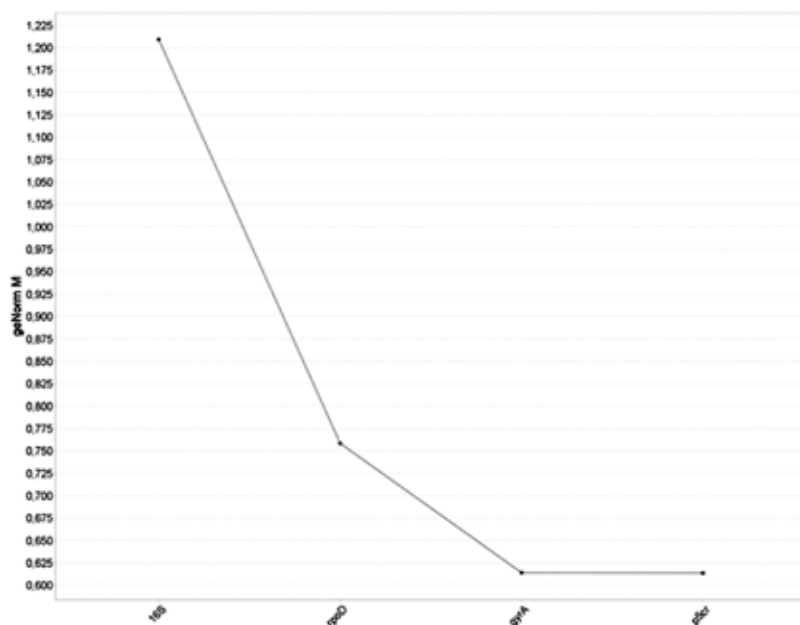


Рис. 3. Индекс стабильности экспрессии для анализируемых референсных генов

Для анализа экспрессии генов феназинового оперона штаммы В-162, В-162/255 и В-162/17 культивировали на питательных средах ПСА и М9 на протяжении разного времени. Были

выбраны временные точки 12 ч, 18 ч и 24 ч, которые соответствуют экспоненциальной стадии роста культуры, и две точки 4,5 сут и 6 сут, которые приходятся на стационарную фа-

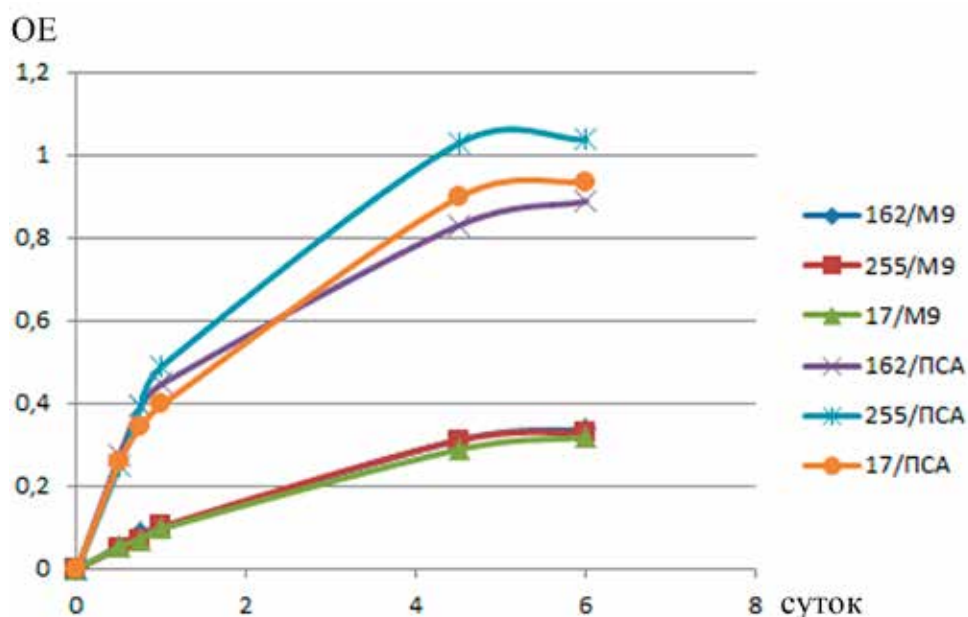


Рис. 4. Кривые роста бактерий В-162, В-162/255 и В-162/17 на средах ПСА и М9

зу роста (рис. 4). Известно, что максимальное количество феназинов накапливается именно на 6-е сут культивирования. Однако экспрессия *phz*-оперона должна происходить на более ранних стадиях, чтобы обеспечить образование всех необходимых ферментов в достаточных количествах. По нашим сведениям, на сегодняшний день не существует исследований, которые бы позволили ответить на вопросы, когда именно начинается эта экспрессия и каков паттерн экспрессии генов феназинового оперона.

На следующем этапе исследования была проведена проверка качества и работоспособности праймеров для всех генов *phz*-оперона на ДНК исследуемых штаммов. Последовательности праймеров и размер ожидаемых ПЦР-продуктов представлены в таблице 1. Как видно из рисунка 5, для каждого из генов оперона были получены фрагменты ожидаемых размеров.

Далее из бактериальных клеток, культивирование которых осуществляли в условиях описанных выше, была выделена РНК. На основе этой РНК была получена кДНК. Последняя, в свою очередь, использовалась для постановки количественной ПЦР для всех генов *phz*-оперона. Затем был рассчитан уровень экспрессии генов оперона относительно выбранных референсных генов.

Для штамма В-162, выращенного на сре-

де М9 в выбранных временных точках роста культуры экспрессия гена *phzA* не была зафиксирована, в то время как уровень экспрессии

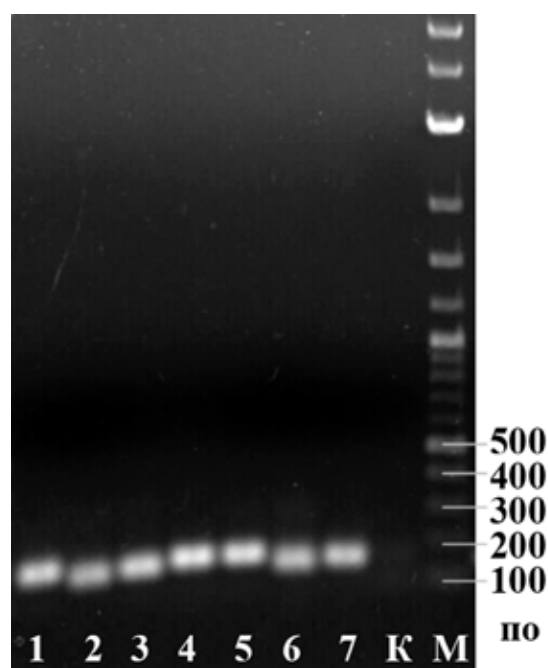


Рис. 5. Электрофорез ПЦР-продуктов фрагментов генов *phz*-оперона

Примечание. ПЦР-продукты: 1 — *phzA*-ген, 2 — *phzB*-ген, 3 — *phzC*-ген, 4 — *phzD*-ген, 5 — *phzE*-ген, 6 — *phzF*-ген, 7 — *phzG*-ген; К — отрицательный контроль, М — маркер молекулярных масс (TriDye™ 1 kb Plus DNA Ladder)

мума к 6 сут культивирования, увеличившись в 6 раз относительно показателя для 12 ч. Уровень экспрессии гена *phzC* (рис. 6) возрастал параллельно с уровнем экспрессии *phzB*-гена. Экспрессию генов *phzDFG*, так же как и экспрессию гена *phzA*, зафиксировать не удалось. Для *phzE*-гена был обнаружен волнообразный характер экспрессии (рис. 6). Очень высокий уровень экспрессии *phzE* наблюдался уже к 12 ч культивирования, однако потом он снижался и полностью исчезал к 24 ч роста культуры, затем снова регистрировался его рост. Достижение пиковых показателей экспрессии данного гена (увеличение экспрессии в 3 раза по сравнению с 12 ч) приходилось на 6 сут культивирования. При культивировании штамма В-162 на питательной среде ПСА в выбранных временных точках роста не удалось зарегистрировать экспрессию генов *phzFG*. После 18 ч культивирования обнаруживается слабый уровень экспрессии генов *phzABD*. Интересно, что на более поздних стадиях роста культуры экспрессия данных генов вообще не регистрируется. На среде ПСА *phzE*-ген демонстрирует высокий уровень экспрессии уже к 12 ч культивирования, а затем уровень постепенно падает, полностью исчезая на 6 сут (рис. 6).

Уровень экспрессии гена *phzC*, растет в период с 12 ч до 24 ч культивирования, после чего падает, снова возобновляется и плавно растет, достигая максимума к 6 сут культивирования (рис. 6).

Для мутантного штамма В-162/255 на среде М9 наблюдается интересный паттерн экспрессии генов *phzAB*: к 12 ч уровень экспрессии гена *phzB* является максимальным, но к 18 ч заметно снижается и в этой же временной точке фиксируется экспрессия *phzA*-гена. Когда к 24 ч экспрессия гена *phzB* практически исчезает, ген *phzA* по-прежнему активен. Далее экспрессия гена *phzA* больше не регистрируется, тогда как ген *phzB* снова начинает экспрессироваться. Ген *phzC* достигает максимального уровня экспрессии к 12 ч роста культуры. Затем его экспрессия постепенно снижается и снова вырастает к 6 сут культивирования (рис. 6). Экспрессия генов *phzDF* обнаружена только для 12-ти часовой культуры, причем уровень экспрессии *phzD*-гена превышает *phzF*-ген в девять раз. Намного больший уровень экспрессии демонстрирует *phzG*-ген, который присутствует не только на 12 ч, но и после 18 ч культивирования. Однако на более поздних стадиях роста, как и в случае с генами

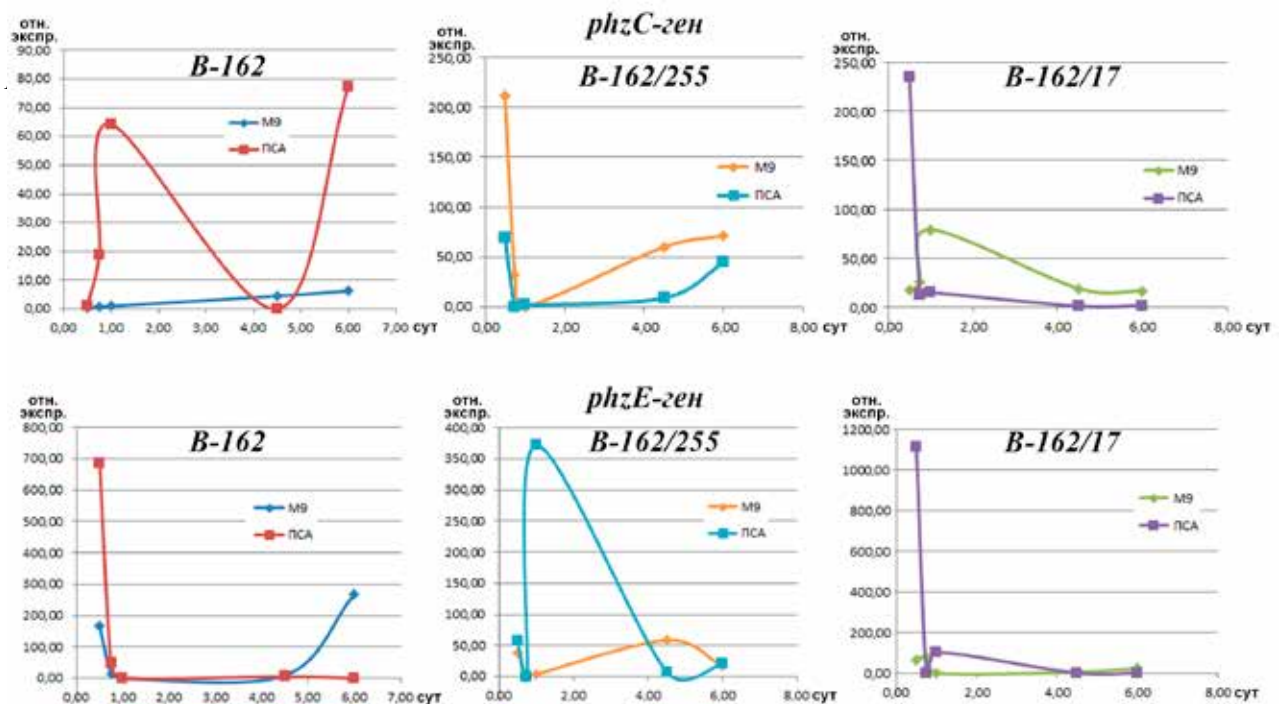


Рис. 6. Уровень экспрессии генов *phzC* и *phzE* исследуемых штаммов В-162, В-162/255 и В-162/17 на средах ПСА и М9

phzDF, мРНК гена *phzG* отсутствует. Для гена *phzE* высокий уровень экспрессии фиксируется уже к 12 ч культивирования, потом снижается к 24 ч роста культуры и снова растет и достигает своего максимума к 4,5 сут, после чего снова постепенно снижается (рис. 6). На среде ПСА у штамма В-162/255 уровни экспрессии всех генов оперона демонстрируют похожий паттерн экспрессии, что и на среде М9.

Для штамма В-162/17 на среде М9 для *phzB*-гена наблюдается рост уровня экспрессии к 18 ч культивирования, после чего экспрессия плавно снижается, в то время как экспрессия гена *phzA* регистрируется только на 4,5 сут культивирования, когда аналогичный показатель для гена *phzB* достигает своего минимума. Изменение уровня экспрессии гена *phzC* в данном случае напоминает таковое для штамма В-162 на среде ПСА: уровень растет, начиная с 12 ч до 24 ч культивирования (рис. 6). После чего уровень экспрессии падает, а затем снова плавно возрастает к 6 сут культивирования. Экспрессию гена *phzD* можно наблюдать на 4,5 и 6-е сут роста бактерии. Уровень экспрессии гена *phzE* плавно растет, достигая своего максимума к 18 ч культивирования, после чего снижается и снова возрастает к 6 сут (рис. 6). Экспрессию генов *phzFG* на данных временных точках роста зарегистрировать не удалось. На среде ПСА снова наблюдается описанная выше взаимосвязь уровней экспрессии генов *phzAB*. Ген *phzC* в данном случае так же, как и ген *phzE*, активно экспрессируется к 12 ч культивирования, после чего показатель уровня экспрессии постепенно снижается и больше не вырастает. Экспрессия генов *phzDFG* наблюдается только в стационарной фазе роста культуры.

Заключение

Таким образом, в ходе данного исследования был проведен анализ уровней экспрессии генов *phz*-оперона у штаммов бактерий *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* (В-162, В-162/255 и В-162/17). Было установлено, что оптимальными референсными генами являются гены, кодирующие пирролин-5-карбоксилат редуктазу и субъединицу А ДНК-гиразы.

Для штаммов В-162/255 и В-162/17 зарегистрирована обратная взаимосвязь между уровнями экспрессии генов *phzA* и *phzB*: если

наблюдается рост экспрессии одного из этих генов, то экспрессия второго снижается. При этом оба гена активнее экспрессируются в экспоненциальной стадии роста.

Паттерн экспрессии гена *phzC*, продукт которого является ключевым ферментом шикиматного пути и первым ферментом биосинтеза феназинов, существенно отличается у всех трех штаммов. Примечательно то, что на среде М9 уровень экспрессии этого гена у мутантных штаммов существенно выше, чем у штамма дикого типа. Если начальные уровни экспрессии *phzC* у В-162 и В-162/255 относительно невысоки, то у штамма В-162/17, способного синтезировать феназины на минимальных средах, этот показатель существенно выше. Возможно, это и является одной из предпосылок приобретения такого рода способности. На среде ПСА уровень экспрессии *phzC*-гена демонстрирует значительные флуктуации, которые не характерны для двух мутантных штаммов. Наблюдаемый пик экспрессии данного гена на среде ПСА у мутантных штаммов на 12 ч культивирования согласуется с данными о более раннем начале экспрессии феназинов у этих мутантных штаммов [14].

Экспрессия гена *phzD* наблюдается в экспоненциальной стадии роста у штамма дикого типа и мутанта В-162/255, у которого она максимальна при культивировании на ПСА, в то время, как у штамма В-162/17 на минимальной среде этот же уровень экспрессии достигается только в стационарной фазе роста.

Гены *phzE* всех исследуемых штаммов, выращенных на минимальной среде, демонстрируют сходные паттерны экспрессии, демонстрируя максимальные результаты на начальной и конечной стадиях культивирования. Экспрессия этих генов на ПСА также схожа у всех трех штаммов: максимальные значения наблюдаются на экспоненциальной стадии роста, после чего к стационарной стадии роста экспрессия заметно снижается.

Отсутствие экспрессии генов *phzF* и *phzG* у штамма В-162, зарегистрированное в данном исследовании, может свидетельствовать о наличии иных генов в геноме данных бактерий, продукты которых в функциональном плане способны заменить белки PhzF и PhzG. Другим возможным объяснением может быть то, что экспрессия этих генов происходит в дру-

гих временных точках, которые в данном исследовании не проверяли, тем более, что для штамма В-162/255 экспрессия данных генов наблюдается на обеих средах на начальных стадиях экспоненциальной фазы (12 ч и 18 ч), а для мутанта В-162/17 слабая экспрессия регистрируется в стационарной фазе роста (4,5 и 6 дней).

Список использованных источников

1. Pierson III, L. S. Metabolism and function of phenazines in bacteria: impacts on the behavior of bacteria in the environment and biotechnological processes / L. S. Pierson III, E. A. Pierson // *Appl. Microbiol. Biotech.* – 2010. – Vol. 86, № 6. – P. 1659–1670.
2. Phenazine antibiotic production and antifungal activity are regulated by multiple quorum-sensing systems in *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca* StFRB508 / T. Morohoshi, [et. al.] // *Biosci. Bioeng.* – 2013. Vol. 116, № 5. – P. 580–584.
3. Arseneault, T. Phenazine production by *Pseudomonas* sp. LBUM223 contributes to the biocontrol of potato common scab / T. Arseneault, C. Goyer, M. Filion // *Phytopathology* – 2013. – Vol. 1. – P. 1–24.
4. Diversity and evolution of the phenazine biosynthesis pathway / D. V. Mavrodi [et. al.] // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2010. – Vol. 76, № 3. – P. 866–879.
5. Genome-wide identification, domain architectures and phylogenetic analysis provide new insights into the early evolution of shikimate pathway in prokaryotes / X.-Y. Zhi [et. al.] // *Molecular Phylogenetics and Evolution.* – 2014. – P. 154–164.
6. Of two make one: the biosynthesis of phenazines / M. Mentel [et. al.] // *Chem. Bio. Chem.* – 2009. – Vol. 10. – P. 2295–2304.
7. Левданская А. И. Анализ генома бактерии *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca* В-162 / А. И. Левданская, Е. Г. Веремеенко, Н. П. Максимова // Сборник научных трудов «Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты» / Беларуская навука. – Минск, 2019. – Том 11. – С. 102–113.
8. Веремеенко Е. Г. Получение и характеристика мутантов *Pseudomonas aurantiaca*, способных к сверхсинтезу феназиновых антибиотиков при культивировании в минимальной среде / Е. Г. Веремеенко, В. В. Лысак, Н. П. Максимова // *Вестник Белорусского государственного университета. Сер. 2, Химия. Биология. География.* – 2010. – № 2. – С. 47–53.
9. Veremeenko E. G. Activation of the Antioxidant Complex in *Pseudomonas aurantiaca* – Producer of Phenazine Antibiotics / E. G. Veremeenko, N. P. Maksimova / *Microbiology.* – 2010. – Vol. 79, № 4. – P. 439–444.
10. Green, M. R. Molecular cloning: a laboratory manual / M. R. Green, J. Sambrook. – Cold Spring Harbor Laboratory Press, 4th ed. New York. – 2012. – P. 365–372.
11. Identification and validation of suitable reference genes for quantitative expression of *xylA* and *xylE* genes in *Pseudomonas putida* mt-2 / C. Chang [et. al.] // *Journal of Bioscience and Bioengineering.* – 2009. – Vol. 107, № 2. – P. 210–214.
12. Selection and validation of reference genes for gene expression studies in *Pseudomonas brassicacearum* GS20 using real-time quantitative reverse transcription PCR / B. Bai [et. al.] // *PLoS ONE.* – 2020. – Vol. 15, № 1. – 15 p.
13. qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data / J. Hellemans [et. al.] // *Genome Biol.* – 2007. 8(2): R19.
14. Веремеенко, Е. Г. Получение, характеристика и применение продуцентов феназиновых антибиотиков бактерий *Pseudomonas aurantiaca*: дис. на соискание ученой степени кандидата биологических наук: 03.02.03 / Е. Г. Веремеенко. – М., 2010. – 157 с.

A. I. Liaudanskaya, A. S. Svetlova, N. P. Maximova, K. G. Verameyenka

EXPRESSION OF THE PHENAZINE OPERON IN *PSEUDOMONAS CHLORORAPHIS* SUBSP. *AURANTIACA* B-162 STRAINS CAPABLE OF OVERPRODUCTION OF PHENAZINE COMPOUNDS

Belarusian State University
4 Nezavisimosty Ave., 220030 Minsk, Republic of Belarus
e-mail: tassigo@gmail.com

For the bacterium *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca* B-162 (wild type) and two mutant strains B-162/255 and B-162/17 capable of overproduction of phenazines, a quantitative evaluation of the *phz*-operon gene expression was carried out during the cultivation of bacteria on full (PMA) and minimal (M9) nutrient media in different phases of culture growth. It was shown that for *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca*, the most optimal reference genes are the genes encoding pyrroline-5-carboxylate reductase (*p5cr*) and the DNA gyrase subunit A (*gyrA*). An inverse relationship between the expression levels of *phzA* and *phzB* genes was registered for B-162/255 and B-162/17 strains. The expression pattern of the *phzC* and *phzD* genes of the B-162/17 strain cultivated on the M9 medium differs markedly from that in the other studied strains grown on both nutrient media. For all the studied strains, a clear relationship between the *phzE* gene expression and the nutrient medium was established. PCR-products of *phzF* and *phzG* genes in the strain B-162/255 were registered from 12 to 18 hours of cultivation, and in the strain B-162/17 they were registered on the 4th-6th day of cultivation, while in the B-162 strain the expression of these genes was not observed at the studied time points.

Keywords: phenazine operon, gene expression, *Pseudomonas*, phenazines.

Дата поступления в редакцию: 22 сентября 2021 г.

Е. В. Лагуновская

ИДЕНТИФИКАЦИЯ МИКРОСАТЕЛЛИТНЫХ ЛОКУСОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ С ЭМБРИОГЕННЫМ ПОТЕНЦИАЛОМ У ГЕНОТИПОВ ПШЕНИЦЫ В КУЛЬТУРЕ ПЫЛЬНИКОВ *IN VITRO*

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

С целью идентификации микросателлитных локусов, которые могут быть использованы в качестве маркеров при скрининге на отзывчивость в культуре пыльников *in vitro*, оценена эффективность андрогенеза *in vitro* у 24 генотипов пшеницы. Выделены контрастные по отзывчивости в культуре пыльников *in vitro* формы, на основе которых получено 4 расщепляющиеся популяции F_2 . Проведено исследование межлинейного полиморфизма по 20 микросателлитным локусам, расположенным на хромосомах 5А и 5В. Обнаружено, что расщепление по способности к эмбриогенезу совпадает с расщеплением по аллелям локуса *Xgwm371*: аллель, имеющий размер 169 п. н., связан с наличием способности к эмбриогенезу; аллель, имеющий размер 185 п. н. — с отсутствием такой способности или крайне низким выходом эмбриоидов, в культуре пыльников *in vitro*.

Ключевые слова: пшеница, культура пыльников *in vitro*, эмбриогенез, линии удвоенных гаплоидов, микросателлитные локусы.

Введение

Использование культуры клеток и тканей для создания новых генотипов растений облегчает и ускоряет традиционный процесс получения новых сортов, а также позволяет повысить эффективность отбора, проводить большую часть работы в зимний период, создавать новые формы, которые невозможно получить с помощью других методов. При этом применение метода культуры пыльников у пшеницы все еще представляет значительную сложность в связи с тем, что эффективность индукции пыльцевого эмбриогенеза сильно зависит от таких факторов, как генотип донорных растений, условий их выращивания, а также предобработок пыльников и условий культивирования [1]. Кроме того, широкому внедрению метода культуры изолированных пыльников в селекционную практику препятствует ряд других обстоятельств: сравнительно низкий выход растений-регенерантов (зачастую многие регенеранты — альбиносы), абортивность зародышей при регенерации, угроза наследственному механизму клеток со стороны некоторых компонентов питательных сред [2].

Выявление сортов и линий, обладающих

способностью к андрогенезу *in vitro*, до введения их в культуру клеток является важнейшей задачей, способствующей повышению эффективности метода культуры пыльников. Основным фактором, определяющим такую способность, является генотип [3]. Однако, поскольку в контроль процессов андрогенеза *in vitro* вовлечено значительное число генов, большая часть которых на данный момент неизвестна, провести скрининг по генотипу достаточно затруднительно. С другой стороны, известно, что микросателлитные маркеры могут быть сцеплены с интересующими исследователя признаками [4, 5]. Для выявления такой связи применяют расщепляющиеся популяции F_2 , полученные от скрещивания родителей, контрастных по проявлению способности к эмбриогенезу *in vitro*. В дальнейшем необходим анализ расщепления в популяциях F_2 как по анализируемому признаку, так и по аллельному состоянию микросателлитных локусов, расположенных на тех же хромосомах, что и локусы, связанные со способностью к эмбриогенезу *in vitro* и последующая оценка степени корреляции между изучаемыми параметрами.

Материалы и методы

Объектом исследования служили сорта, линии удвоенных гаплоидов и гибридные генотипы мягкой пшеницы.

Для культивирования пыльников срезанные колосья выдерживали в течение 7 дней при +4 °С, пыльники изолировали на стадии поздних одноядерных микроспор и культивировали по методике [4]. Отзывчивость в культуре пыльников определяли для каждого индивидуального растения в отдельности. Расщепление по способности к андрогенезу *in vitro* рассчитывалось по соотношению количества растений, в ходе культивирования пыльников которых были получены эмбриониды и регенеранты, вне зависимости от количества последних. Способность к образованию хотя бы одной эмбрионидной структуры оценивалась как 1, неспособность — 0. По такому же принципу оценивалась способность к регенерации. Данные, полученные при подсчете расщепления по признаку «способность к эмбриогенезу» и «способность к регенерации» округлялись до целых чисел.

Для получения гибридов F₁ растения пшеницы выращивали в условиях фитотронно-тепличного комплекса. Посев осуществляли в пяти повторностях. Для скрещивания брали по 15 растений. Скрещивание проводилось путем ограниченно свободного опыления: после элиминации пыльников материнских растений на них надевались изоляторы, под которые подводились мужские растения со зрелыми пыльниками, по два мужских колоса на один колос материнской формы. Были проведены прямые и обратные скрещивания между контрастными по отзывчивости в культуре пыльников *in vitro* генотипами.

Выделение геномной ДНК проводили из зерновок стандартным фенольно-хлороформным методом [5]. Анализ качества и количества выделенной ДНК проверяли в 1%-ном агарозном геле и на спектрофотометре «Ultrospec 3300pro» (Amersham Biosciences).

Для анализа межлинейного полиморфизма были выбраны 20 микросателлитных локусов, находящихся на хромосомах 5А (*Xgwm304*, *Xgwm415*, *Xgwm154*, *Xgwm205*, *Xgwm293*, *Xgwm156*, *Xgwm595*, *Xgwm186*, *Xgwm126*, *Xgwm291*) и 5В (*Xgwm324*, *Xgwm443*, *Xgwm544*, *Xgwm540*, *Xgwm499*, *Xgwm335*, *Xgwm67*,

Xgwm371, *Xgwm554*, *Xgwm406*). Последовательности праймеров подбирали с использованием базы данных GrainGenes [6]. ПЦР проводили в объеме 25 мкл, содержащем из расчета на одну реакцию: MgCl₂ — 2 мМ; прямого и обратного праймеров к одному из маркеров — по 0,1 пМ; дНТФ — 80 мкМ; 1 единицу *Taq*-полимеразы в инкубационном буфере; деонизированную стерильную воду — 13,7 мкл. Концентрация геномной ДНК составляла 100 нг на 25 мкл. Программа амплификации: 94 °С — 3 мин (94 °С — 1 мин, T_{отжига} °С — 2 мин, 72 °С — 2 мин) — 40 циклов); 72 °С — 10 мин. Температуру отжига выбирали в зависимости от последовательности праймера: 54 °С — *Xgwm335*; 55 °С — *Xgwm304*, *Xgwm415*, *Xgwm154*, *Xgwm293*, *Xgwm443*, *Xgwm544*, *Xgwm408*; 57 °С — *Xgwm234*, *Xgwm540*; 59 °С — *Xgwm186*; 60 °С — *Xgwm205*, *Xgwm156*, *Xgwm126*, *Xgwm499*, *Xgwm67*, *Xgwm554*; 64 °С — *Xgwm595*, *Xgwm291*, *Xgwm371*.

Для получения анализируемых фрагментов проводили ПЦР с мечеными праймерами к выбранным локусам: в каждой паре «прямой–обратный праймер» один из праймеров метился флуоресцентным красителем. Использовались следующие флуоресцентные метки: R6G для праймера к локусу *Xgwm540*; FAM для праймера к локусу *Xgwm595*; TAMRA для праймеров к локусам *Xgwm291*; ROX для праймера к локусу *Xgwm371*. Размеры полученных продуктов амплификации определяли методом вертикального электрофореза в полиакриламидном геле и с помощью капиллярного электрофореза. Вертикальный электрофорез проводили в 6% полиакриламидном геле и 0,5X TBE буфере при напряжении от 40 до 100 В на протяжении 4–5 ч. Окраску геля проводили в кюветах с раствором 10% бромистого этидиума 15–30 мин из расчета 3 мкл бромистого этидиума на 100 мл воды. Визуализацию осуществляли в ультрафиолетовом свете с использованием системы гель-документации Quantum ST4-1100, расчет размера полученных фрагментов выполняли с помощью программы Quantum-Capt, поставляемой с системой гель-документации. Капиллярный электрофорез проводили на генетическом анализаторе 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Для этого в лунки платы вносили 1 мкл получен-

ного ПЦР-продукта, 9 мкл деионизированного формамида и 0,5–1 мкл внутреннего стандарта Orange DNA Size Standard (MCLab), который использовался в качестве маркера молекулярного веса. Анализ полученных данных осуществляли с помощью программы GeneMapper v.5.0. Информация об аллельном составе SSR-локусов у изученных образцов была занесена в электронную базу данных в формате Microsoft Excel–2003. Наличие определенного амплифицированного фрагмента ДНК у данного генотипа обозначали цифрой «1», отсутствие — «0». Для расчета частот аллелей микросателлитных локусов в популяциях F_2 использовали надстройку для электронной таблицы MS Excel — GenAIEx 6.41 [7]. Для расчета коэффициента Пирсона использовали MS Excel.

Результаты и обсуждение

Поскольку для создания расщепляющей-

ся популяции по способности к андрогенезу *in vitro* следует подобрать родительские генотипы, контрастные по исследуемому признаку, необходимо оценить потенциальные родительские генотипы по отзывчивости в культуре пыльников. Для этого был проведен скрининг имеющихся форм пшеницы по их способности к андрогенезу *in vitro*.

В культуру пыльников было введено 24 генотипа пшеницы и оценена их андрогенетическая способность по таким параметрам, как «частота индукции эмбриогенеза» (от числа посаженных пыльников), а также «частота регенерации растений», «частота регенерации зеленых растений», «частота регенерации альбиносных растений» (на 100 посаженных пыльников) (табл. 1) Часть полученных данных была опубликована нами ранее [8].

Для индукции эмбриогенеза пыльники помещали на жидкую среду С-17, первые эмбри-

Таблица 1

Эффективность эмбриогенеза в культуре пыльников *in vitro* у сортов, сортообразцов и линий удвоенных гаплоидов пшеницы

Генотип	1 год		2 год		3 год	
	Э*	Р* (зел./альб.)	Э*	Р* (зел./альб.)	Э*	Р* (зел./альб.)
DH 222-1-1 × DH 61-14	454,8	47,6/42,9	1,1	0/0	4,3	0/0
DH 61-14 × DH 222-1-1	203,4	35,7/10,9	36,6	4,3/2,0	0	0/0
DH 61-14	–	–	0	0/0	0	0/0
DH 222-1-1	–	–	0	0/0	0	0/0
Людмила	3,03	0/0	0	0/0	–	–
BOR	0,80	0/0	0	0/0	–	–
BOR × Людмила	2,40	0/0	0	0/0	–	–
Людмила × BOR	2,50	0/0	0	0/0	–	–
(BOR × Людмила) × BOR	4,72	0/0	0	0/0	–	–
DH 48-02-06	–	–	–	–	42,7	4,9/4,6
DH 52-02-06	–	–	–	–	24,7	5,9/3,7
Ростань	0,90	0/0	0	0/0	0	0/0
DH 64-18	22,62	0/0	0	0/0	–	–
Ростань × DH 64-18	3,6	0/0	1,59	0/0	0,5	0/0
DH 64-18 × Ростань	36,2	2,1/10,6	–	–	2,3	4,5/0,9

Окончание таблицы 1

Генотип	1 год		2 год		3 год	
	Э*	Р* (зел./альб.)	Э*	Р* (зел./альб.)	Э*	Р* (зел./альб.)
du-115	0	0/0	0	0/0	–	–
du-115 × Ростань	2,8	0,8/0,4	0	0/0	0	0/0
Ростань × du-115	2,96	0/0	0	0/0	–	–
Ростань × ДН 61-14	0,41	0/0	–	–	–	–
du-115 × ДН 222-1-1	16,7	0/0,6	–	–	–	–
Рассвет	6,1	0/0	0	0/0	–	–
ДН 66-(2)-6	23,4	0,5/0,2	–	–	0,7	0/0
ДН 220-2-2	5,1	0/0	0	0/0	–	–
Дарья	101,9	0/0	–	–	0	0/0

Примечание. Э — количество полученных эмбриоидов; Р — количество полученных регенерантов; * — из расчета на 100 пыльников, “–” — генотип не анализировался

огенные структуры развивались на 30–35 сутки культивирования (рис. 1, А). Пересадка на среду для регенерации MSR осуществлялась при достижении эмбриоидами диаметра около 1 мм. Новообразования меньшего размера, согласно нашим наблюдениям, практически не способны к регенерации полноценного растения-регенеранта.

Под растением-регенерантом подразумевается стерильное растение с развитой системой корней и побегов, сформированных *in vitro*. Его получение является основным звеном любой биотехнологической методики, поскольку без успешной регенерации теряют смысл эксперименты по соматической гибридизации, гаплоидии, клеточной селекции, микроклональному размножению растений.

В наших исследованиях после помещения эмбриоидов на среду для регенерации в большинстве случаев отмечались интенсивные процессы дифференцировки клеток. Они шли, главным образом, в двух направлениях: регенерация целого растения (гемморизогенез), либо только ризогенез, без формирования побегов. Первый путь развития был отмечен у 10 генотипов, у которых были получены растения-регенеранты (табл. 1). В остальных случаях либо не наблюдалось образования эмбриоидов, либо их культивирование приво-

дило к разрастанию недифференцированной каллусной массы. В результате дальнейшего культивирования таких каллусов в ряде случаев происходило интенсивное формирование корней, но формирования побегов не происходило. Отдельные этапы получения растений-регенерантов пшеницы методом культуры пыльников представлены на рисунке 1, аномальные пути морфогенеза в культуре пыльников *in vitro* — на рисунке 2.

Анализ полученных нами данных позволяет говорить о том, что наибольшую отзывчивость в культуре пыльников проявили реципрокные гибриды линий удвоенных гаплоидов ДН 222-1-1 и ДН 61-14 (ДН 222-1-1 × ДН 61-14 и ДН 61-14 × ДН 222-1-1) и линии удвоенных гаплоидов ДН 48-02-06 и ДН 52-02-06, полученные на их основе. При этом родительские генотипы ДН 222-1-1 и ДН 61-14 проявили нулевую способность к пыльцевому эмбриогенезу наряду с сортом Ростань и сортообразцом du-115. Также высокую отзывчивость проявил гибрид ДН 64-18 × Ростань при полном отсутствии пыльцевого эмбриогенеза у одного родителя и низкой эмбриогенной активности другого.

В результате проведенного скрининга для дальнейшего определения микросателлитных локусов, связанных с отзывчивостью в культуре пыльников *in vitro* был отобран сорт мягкой

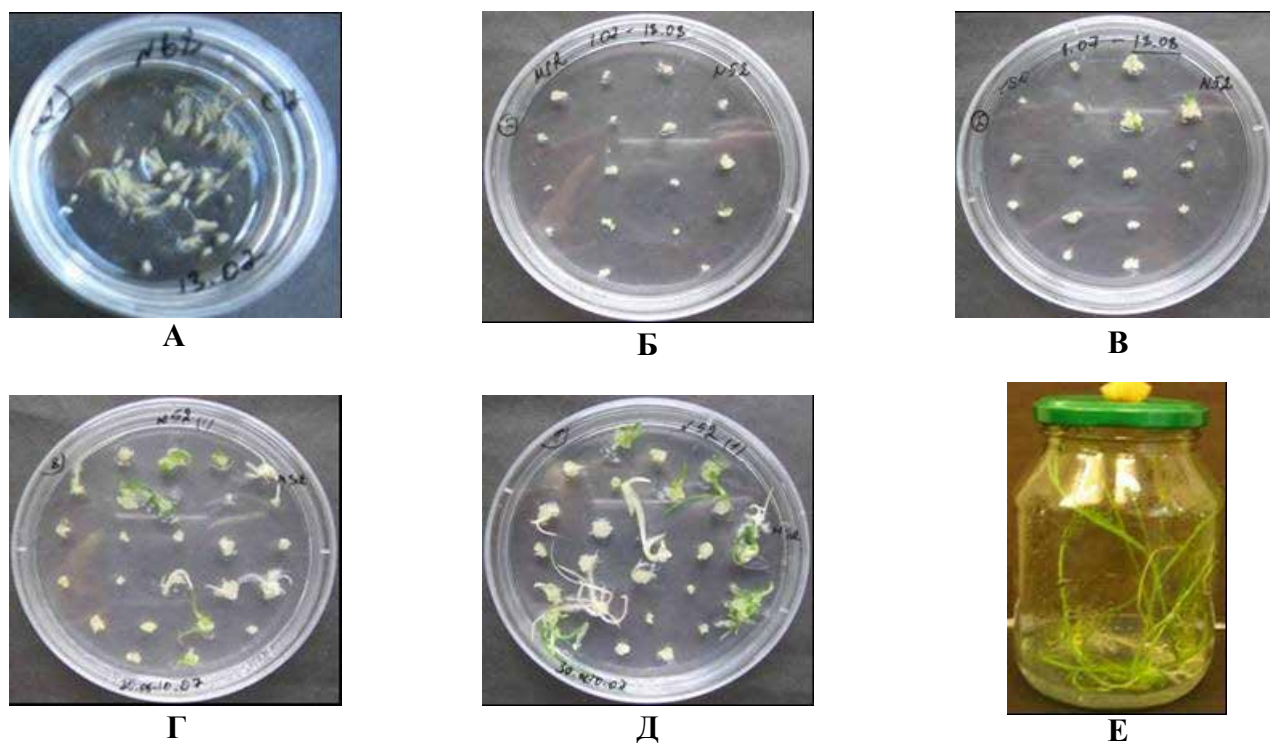


Рис. 1. Этапы получения растений-регенерантов методом культуры пыльников у гибрида пшеницы DH 222-1-1 × DH 61-14 на 35-ый (А), 40-й (Б), 47-й (В), 56-й (Г), 60-й (Д) и 75-й (Е) день культивирования *in vitro*

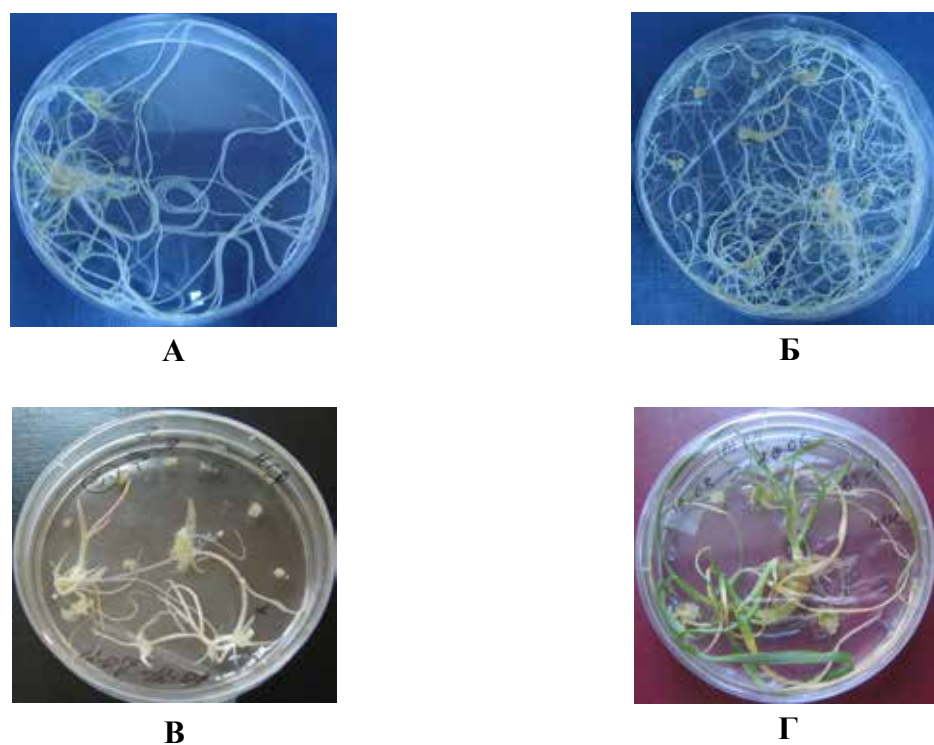


Рис. 2. Аномальные пути развития эмбриондов пшеницы в культуре пыльников *in vitro* (А, Б) только ризогенез (без развития побегов); (В) развитие хлорофилл-дефектных растений; (Г) только геммогенез (без развития корней)

яровой пшеницы Ростань с низкой отзывчивостью в культуре пыльников *in vitro* и 2 линии удвоенных гаплоидов (DH 48-02-06 и DH 52-02-06), с высокой отзывчивостью.

Получение популяции гибридов F_1 и F_2 , контрастных по способности к андрогенезу *in vitro* форм мягкой пшеницы

С целью получения гибридов F_1 были проведены реципрокные скрещивания генотипов, контрастных по способности к андрогенезу *in vitro*: сорта мягкой яровой пшеницы Ростань с низким эмбриогенным потенциалом и линий удвоенных гаплоидов мягкой яровой пшеницы (DH 48-02-06, DH 52-02-06), с высоким эмбриогенным потенциалом в культуре пыльников *in vitro*.

Максимальную завязываемость зерновок наблюдали при скрещивании удвоенного гаплоида DH 48-02-06 (материнское растение) и сорта Ростань (отцовское растение), минимальную — при скрещивании удвоенного гаплоида DH 52-02-06 (материнское растение) и сорта Ростань (отцовское растение).

На основе полученных гибридов F_1 мягкой яровой пшеницы было создано четыре популяции гибридных растений F_2 . Полученные растения были использованы в качестве доноров пыльников при введении в культуру *in vitro* (табл. 2).

Обнаружено, что гибридные генотипы пшеницы, полученные нами от скрещивания контрастных по отзывчивости в культуре пыльников

Таблица 2

Эффективность андрогенеза *in vitro* гибридов F_2 мягкой пшеницы

Популяция	Посажено пыльников	Получено эмбрионов*	Получено регенерантов*	
			Зеленых	Альбиносных
DH 48-02-06 × Ростань	756	15,61	0,78	0
Ростань × DH 48-02-06	1629	10,99	1,04	0,43
DH 52-02-06 × Ростань	452	23,67	4,42	0,44
Ростань × DH 52-02-06	896	17,97	0,78	0

Примечание. * — из расчета на 100 инокулированных пыльников

ков *in vitro* форм, проявили способность как к эмбриогенезу, так и к регенерации *in vitro*, однако у индивидуальных растений в пределах каждой популяции наблюдался большой разброс значений по указанным параметрам. Полученные данные были использованы при оценке связи аллельного состояния некоторых микросателлитных локусов с эффективностью андрогенеза *in vitro*.

Оценка влияния аллельного состояния микросателлитных локусов на эффективность андрогенеза *in vitro* у родительских линий мягкой пшеницы

Генотип донорного растения является основополагающим фактором, детерминирующим эффективность пыльцевого эмбриогенеза и органогенеза в культуре клеток *in vitro*, определяющим до 85% изменчивости по дан-

ному признаку [3, 10]. Вместе с тем данные о генетическом контроле отзывчивости растений к культивированию тканей, в частности, о генах, контролирующих пыльцевой эмбриогенез, отрывочны и противоречивы [10–12]. Решить эту проблему можно, используя SSR-маркеры. Метод основан на определении сцепления микросателлитных маркеров и исследуемых признаков в популяциях гибридов второго поколения.

Среди злаков микросателлитные повторы достаточно хорошо изучены и широко используются в качестве молекулярных маркеров у представителей родов, имеющих важное сельскохозяйственное значение, таких как пшеница (*Triticum* L.), рожь (*Secale* L.), ячмень (*Hordeum* L.). У злаков на повторяющиеся последовательности приходится от 15% до 80%

генома, в частности, молекулярно-генетическая карта *T. aestivum* содержит более 1 500 SSR-маркеров [13–15].

Пул некодирующих повторяющихся последовательностей ДНК в геноме подвергается постоянным изменениям. Гетерогенность повторяющихся последовательностей лежит в основе использования их в качестве высокополиморфных генетических маркеров как для селекционной работы, так и в эволюционных исследованиях.

Известно, что на процессы андрогенеза в культуре пыльников *in vitro* у пшеницы так или иначе влияют практически все хромосомы генома, в частности хромосомы 2A, 3A, 5A, 1B, 2B, 5B, 1D, 2D, 6D и 7D [3, 10, 11]. Поскольку к настоящему времени получены многочисленные данные о значительном вкладе в эффективность андрогенеза генов, расположенных на хромосомах 5 гомеологической группы, а именно 5A и 5B [10, 11, 16, 17], основное внимание в наших исследованиях было сосредоточено на изучении микросателлитных локусов, локализованных на данных хромосомах.

Для того чтобы при анализе расщепляющейся популяции F_2 определить, сцеплены ли микросателлитные маркеры с конкретным признаком, необходимо было определить полиморфизм по каждому из локусов у родительских генотипов.

Для получения первичных данных о наличии либо отсутствии полиморфизма по определенным SSR-локусам у сортов и линий удвоенных гаплоидов, контрастных по способности к индукции андрогенеза в культуре пыльников *in vitro*, проводили ПЦР с праймерами, подобранными к каждому SSR-локусу. Ранее нами было показано, что при разделении продуктов амплификации в 6% полиакриламидном

геле у исследуемых родительских генотипов гибридов F_2 мягкой яровой пшеницы (сорт Ростань, линии удвоенных гаплоидов ДН 52-02-06, ДН 48-02-06) обнаружен межлинейный полиморфизм по трем микросателлитным локусам, расположенным на хромосоме 5A (*Xgwm186*, *Xgwm291*, *Xgwm595*) и четырем микросателлитным локусам, расположенным на хромосоме 5B (*Xgwm540*, *Xgwm371*, *Xgwm335*, *Xgwm234*). По остальным исследованным SSR-локусам полиморфизм не выявлен [18].

Таким образом, были получены первичные данные о наличии полиморфизма по исследуемым микросателлитным локусам. Однако, поскольку разделение продуктов амплификации в полиакриламидном геле не позволяет выяснить точный размер полученных фрагментов, потребовалось проведение дополнительных исследований с использованием метода капиллярного гель-электрофореза.

Проведенный с использованием данного метода анализ размеров амплифицированных фрагментов подтвердил наличие полиморфизма только для четырех из семи микросателлитных локусов, отобранных нами на основании результатов разделения ПЦР-продуктов в полиакриламидном геле. Полученные с помощью капиллярного гель-электрофореза размеры фрагментов отличались от размеров, выявленных с помощью полиакриламидного геля, но, так как разрешающая способность метода капиллярного электрофореза значительно выше, в дальнейшем мы руководствовались данными, полученными с его помощью. Для локусов *Xgwm291*, *Xgwm371*, *Xgwm595* и *Xgwm540* было выявлено два различных фрагмента (по одному для каждого генотипа) (табл. 3).

Для локуса *Xgwm291* были выявлены фрагменты размером 168 п. н. у сорта Ростань

Таблица 3

Полиморфизм по микросателлитным локусам у генотипов пшеницы, контрастных по параметрам андрогенеза *in vitro* (разделение продуктов амплификации с помощью капиллярного гель-электрофореза)

Генотип	<i>Xgwm291</i>	<i>Xgwm371</i>	<i>Xgwm595</i>	<i>Xgwm540</i>
Ростань	168 п. н.	185 п. н.	182 п. н.	132 п. н.
ДН 48-02-06	140 п. н.	169 п. н.	182 п. н.; 146 п. н.	130 п. н.
ДН 52-02-06	140 п. н.	169 п. н.	182 п. н.; 140 п. н.	132 п. н.

и 140 п. н. у обеих линий удвоенных гаплоидов.

По локусу *Xgwm371* было также выявлено два различных фрагмента: 169 п. н. у линий удвоенных гаплоидов ДН 48-02-06 и ДН 52-02-06 и 185 п. н. у сорта Ростань.

По локусу *Xgwm595* у всех генотипов выявлен фрагмент размером 182 п. н. и дополнительные фрагменты размером 146 п. н. у удвоенного гаплоида ДН 48-02-06, а также дополнительный фрагмент размером 140 п. н. у удвоенного гаплоида ДН 52-02-06.

По локусу *Xgwm540* у удвоенного гаплоида ДН 48-02-06 выявлен фрагмент размером 130 п. н., у удвоенного гаплоида ДН 52-02-06 и сорта Ростань — фрагмент размером 132 п. н. Однако, поскольку различия по размеру фрагментов у родительских форм не превышают два нуклеотида, данный локус не анализировался как полиморфный для исследуемых генотипов.

Таким образом, в ходе проведенного исследования выявлен четкий полиморфизм по трем микросателлитным локусам у генотипов пшеницы, контрастных по отзывчивости в культуре пыльников *in vitro*. Использование полиакриламидного геля позволяет выявлять полиморфизм по микросателлитным локусам у пшеницы и снижает затраты на проведение исследований при скрининге большего количества генотипов, однако для окончательной

оценки и точного определения размера полученных фрагментов целесообразно использовать метод капиллярного гель-электрофореза.

Анализ расщепляющейся популяции гибридов F_2 пшеницы по соотношению аллелей полиморфных микросателлитных локусов.

На следующем этапе проводили анализ наследования полиморфизма по микросателлитным локусам в расщепляющейся популяции гибридов F_2 . Всего по каждому из 4 микросателлитных локусов, проявивших полиморфизм у родительских генотипов, проанализировано 95 растений F_2 из 4 популяций: популяция 1 [ДН 48 × Ростань] — 19 растений, популяция 2 [ДН 52 × Ростань] — 12 растений, популяция 3 [Ростань × ДН 48] — 41 растение, популяция 4 [Ростань × ДН 52] — 23 растения.

Была оценена частота встречаемости фрагмента определенной длины для каждого локуса в каждой популяции. Различия в размерах амплифицируемых фрагментов считали различными аллельными состояниями соответствующего локуса. Поскольку по локусу *Xgwm595* полиморфизм проявлялся в наличии либо отсутствии фрагментов размером 140 п. н. или 146 п. н., отсутствие обоих фрагментов указанного размера считали нуль-аллелем (табл. 4).

Полученные данные свидетельствуют о неравномерном распределении различных алле-

Таблица 4

Частота встречаемости аллелей микросателлитных локусов в гибридных популяциях пшеницы, полученных от скрещивания генотипов, контрастных по способности к андрогенезу *in vitro*

Гибридная популяция	<i>Xgwm291</i>		<i>Xgwm371</i>		<i>Xgwm595</i>		
	140 п. н.	168 п. н.	169 п. н.	185 п. н.	Нуль-аллель	140 п. н.	146 п. н.
ДН 48-02-06 × Ростань	0,68	0,32	0,76	0,24	0,63	0	0,36
Ростань × ДН 48-02-06	0,06	0,94	0,63	0,37	0,70	0	0,30
ДН 52-02-06 × Ростань	0,04	0,96	0,56	0,44	0,96	0	0,04
Ростань × ДН 52-02-06	0,09	0,91	0,48	0,52	0,85	0	0,15

лей локуса *Xgwm291* в популяциях, полученных в результате реципрокных скрещиваний. Так, соотношение аллеля 140 п. н. и 168 п. н. в популяции 1 (DH 48-02-06 × Ростань) составило 68% и 32% соответственно, а в популяции 2 (Ростань × DH 48) — 6% и 94%. По остальным исследованным локусам в популяциях, полученных в результате реципрокных скрещиваний, наблюдались достаточно сопоставимые данные.

По локусу *Xgwm595* у гибридов выявлялись только нуль-аллель и аллель 146 п. н. Аллель

размером 140 п. н., обнаруженный у удвоенного гаплоида DH 52-02-06, у гибридов, полученных с его участием (DH 52-02-06 × Ростань и Ростань × DH 52-02-06), не выявлен.

На основании полученных результатов, а также данных о способности к андрогенезу *in vitro* у индивидуальных растений исследуемых генотипов, были рассчитаны расщепления по параметрам пыльцевого эмбриогенеза и частотам определенных аллелей микросателлитных локусов в популяции гибридов F₂ (табл. 5).

Таблица 5

Расщепление по параметрам андрогенеза *in vitro* и аллелям микросателлитных локусов у гибридов F₂ мягкой яровой пшеницы

Гибридная популяция	Способность к эмбриогенезу (есть/нет)	Способность к регенерации (есть/нет)	Полиморфизм по микросателлитным локусам		
			<i>Xgwm291</i> (140/168 п. н.)	<i>Xgwm371</i> (169/185 п. н.)	<i>Xgwm595</i> (null/146 п. н.)
DH 48-02-06 × Ростань	3:1 ($\chi^2 = 0,017$; P = 0,895)	1:5 ($\chi^2 = 0,016$; P = 0,90)	2:1 ($\chi^2 = 0,026$; P = 0,87)	3:1 ($\chi^2 = 0,018$; P = 0,90)	2:1 ($\chi^2 = 0,105$; P = 0,75)
Ростань × DH 48-02-06	1:1 ($\chi^2 = 0,220$; P = 0,64)	1:7 ($\chi^2 = 0,160$; P = 0,69)	1:16 ($\chi^2 = 0,003$; P = 0,95)	1:1 ($\chi^2 = 0,220$; P = 0,64)	2:1 ($\chi^2 = 0,149$; P = 0,70)
DH 52-02-06 × Ростань	2:1 ($\chi^2 = 0$; P = 1)	1:2 ($\chi^2 = 0$; P = 1)	1:24 $\chi^2 = 0,001$; P = 0,98)	2:1 ($\chi^2 = 1,313$; P = 0,25)	24:1 ($\chi^2 = 0,001$; P = 0,98)
Ростань × DH 52-02-06	1:1 ($\chi^2 = 0,390$; P = 0,53)	1:22 ($\chi^2 = 0$; P = 1)	1:10 ($\chi^2 = 0,004$; P = 0,95)	1:1 ($\chi^2 = 0,043$; P = 0,84)	6:1 ($\chi^2 = 0,016$; P = 0,90)

Анализ полученных данных показал, что расщепление по аллелям локуса *Xgwm371* у исследованных индивидуальных растений F₂ полностью совпадает с расщеплением по их способности образовывать эмбриониды в культуре пыльников *in vitro*. Аллель, имеющий размер 169 п. н., связан с наличием способности к эмбриогенезу; аллель, имеющий размер 185 п. н. — с отсутствием такой способности

или крайне низким выходом эмбрионидов. Для уточнения полученных данных был рассчитан суммарный коэффициент Пирсона для всех исследованных популяций. Оценивалась корреляция между количеством отзывчивых либо неотзывчивых индивидуальных растений и индивидуальных растений, несущих тот или иной аллель в локусе *Xgwm371*. Рассчитанный коэффициент Пирсона оказался близким к 1,

что говорит о наличии тесной связи между исследуемыми параметрами, и подтверждает полученную информацию о связи микросателлитного локуса *Xgwm371* с отзывчивостью в культуре пыльников у пшеницы. Связь между аллельным состоянием локусов *Xgwm291* и *Xgwm595* и параметром андрогенеза *in vitro* «способность к эмбриогенезу» в исследуемых популяциях проследить не удалось. Также не было выявлено зависимости между аллельным составом исследованных микросателлитных локусов и параметром «способность к регенерации».

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что микросателлитный локус *Xgwm371*, расположенный на длинном плече хромосомы 5В, сцеплен с параметром андрогенеза *in vitro* «способность к эмбриогенезу». Исходя из полученных данных, аллель 169 локуса *Xgwm371* может являться SSR-маркером для выявления отзывчивых в культуре пыльников *in vitro* генотипов пшеницы.

Заключение

Комплексное исследование, проведенное на расщепляющихся популяциях F_2 , полученных от скрещивания сортов и линий удвоенных гаплоидов пшеницы, контрастных по отзывчивости в культуре пыльников *in vitro*, позволило идентифицировать микросателлитный локус *Xgwm371*, аллельное состояние которого имеет прямую корреляцию с эффективностью андрогенеза *in vitro* у изученных нами генотипов пшеницы. Мы полагаем, что аллель 169 SSR-локуса *Xgwm371* можно рассматривать в качестве кандидата для обнаружения отзывчивых в культуре пыльников *in vitro* генотипов пшеницы.

Список использованных источников

1. Testillano, P. S. Microspore embryogenesis: Targeting the determinant factors of stress-induced cell reprogramming for crop improvement // P. S. Testillano / J. Exp. Bot. – 2019. – Vol. 70. – P. 2965–2978.
2. Lantos, C. Anther culture as an effective tool in winter wheat (*Triticum aestivum* L.) breeding // C. Lantos, J. Pauk / Russ. J. Genet. – 2016. Vol. 52. – P. 794–801.
3. Chromosomal regions associated with the *in vitro* culture response of wheat (*Triticum aes-*

tivum L.) microspores // N. H. Nielsen [et al.] / Plant Breeding. – 2015. – Vol. 134, № 3. – P. 255–263.

4. Mason, A. S. SSR genotyping // A. S. Mason / Methods Mol. Biol. – 2015. – Vol. 1245. – P. 77–89.

5. Идентификация микросателлитных локусов по данным секвенирования ВАС-клонов и их физическое картирование на хромосому 5В мягкой пшеницы // М. А. Нестеров [и др.] / Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2015. – Т. 19, № 6. – С. 707–714.

6. Лагуновская, Е. В. Эффективность использования различных типов индукционных питательных сред при культивировании пыльников гексаплоидного тритикале // Е. В. Лагуновская, О. И. Зайцева, В. А. Лемеш // Факторы экспериментальной эволюции организмов: Сб. науч. трудов / Национальная академия наук Украины, Институт молекулярной биологии и генетики, Укр. о-во генетиков и селекционеров им. Н. И. Вавилова; редкол.: В. А. Кунах (гл. ред.) [и др.]. – К.: Укр. о-во генетиков и селекционеров им. Н. И. Вавилова, 2019. – Т. 25. – С. 260–265.

7. Дорохов, Д. Б. Быстрая и экономичная технология RAPD анализа растительных геномов / Д. Б. Дорохов, Э. Клоке // Генетика. – 1997. – Т. 33, № 4. – С. 443–450.

8. GrainGenes [Electronic resource]. – Mode of access: <https://wheat.pw.usda.gov/cgi-bin/GG3/browse.cgi>. – Date of access: 03.09.2021.

9. Peakall, R. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research – an update / R. Peakall, P. E. Smouse // Bioinformatics. – 2012. – Vol. 28, № 19. – P. 2537–2539.

10. Орлов, П. А. Генетические механизмы пыльцевого эмбриогенеза и его использование в селекции растений / П. А. Орлов, Е. В. Антоненко // Молекулярная и прикладная генетика. – 2007. – Т. 5. – С. 44–71.

11. A simple wheat haploid and doubled haploid production system using anther culture // K. M. Kim, P. S Baenziger / *In Vitro Cell.Dev. Biol.-Plant*. – 2005. –Vol. 41. – P. 22–27.

12. Identification of QTLs associated with tissue culture response of mature wheat embryos // J. Ma [et al.] / SpringerPlus. – 2016. – 5(1): 1552.

13. Torp, A. Chromosomal regions associated with green plant regeneration in wheat (*Triticum*

- aestivum* L.) anther culture // A. Torp, A. Hansen, S. Andersen / *Euphytica*. – 2001. – Vol. 119. – P. 377–387.
14. Chromosomal effects on in vitro morphogenesis in wheat intervarietal substitution lines // N. D. Tyankova [et al.] / *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding*. – 2006. – Vol. 42. – P. 15–19.
15. Putative Microsatellite DNA Marker-Based Wheat Genomic Resource for Varietal Improvement and Management // S. Jaiswal [et al.] / *Front. Plant Sci.* – 2017. /<https://doi.org/10.3389/fpls.2017.02009>.
16. Адонина, И. Г. Характеристика сателлитных повторов видов *Aegilops* 1. секции *Sitopsis* и их использование в качестве молекулярных маркеров: автореф. дис. ... канд. биол. наук : 03.00.15 / И. Г. Адонина; СО РАН – Новосибирск, 2007. – 19 с.
17. Röder, M. Wheat Microsatellites: Potential and Implications / M. Röder, X. Q. Huang, M. Ganai // *Molecular Marker Systems in Plant Breeding and Crop Improvement / Biotechnology in Agriculture and Forestry* / eds H. Lörz, G. Wenzel / Springer, Berlin, Heidelberg, 2004. – Vol. 55. – P. 255–256.
18. QTL mapping for anther culturability in wheat using a doubled-haploid population / L. Y. Zhang [et al.] // *Proceed. of the 10th International Wheat Genetic Symposium, Paestum 1–6 September 2003, Italy* / Eds N. E. Pogna [et al.]. – Paestum, 2003. – P. 1078–1080.
19. Quantitative trait loci associated with androgenic responsiveness in triticale (*×Triticosecale* Wittm.) anther culture // M. Krzewska [et al.] / *Plant cell reports*. 2012. – Vol. 31, № 11. – P. 2099–2108.
20. Сравнительный анализ полиморфизма локусов хромосомы 5А у пшеницы и тритикале с использованием SSR-маркеров // Антоненко Е. В. [и др.] / *Молекулярная и прикладная генетика: сборник научных трудов. / Институт генетики и цитологии НАН Беларуси; редкол.: А.В. Кильчевский и [др.]. – Минск: ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси», 2013. – Т. 15. – С. 54–63.*

E. V. Lagunovskaya

**IDENTIFICATION OF MICROSATELLITE LOCI ASSOCIATED WITH
EMBRYOGENIC POTENTIAL IN WHEAT GENOTYPES IN ANther
CULTURE *IN VITRO***

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: e.antonenko@igc.by

In order to identify microsatellite loci that can be used as markers in screening for responsiveness in the *in vitro* anther culture, the efficiency of androgenesis *in vitro* was evaluated in 24 wheat genotypes. The forms contrasting in responsiveness in the *in vitro* anther culture were identified, and four F₂ segregating populations were obtained on their basis. The study of interlinear polymorphism by 20 microsatellite loci located on chromosomes 5A and 5B was carried out. It was found that the cleavage by the ability to embryogenesis coincides with the cleavage by the alleles of the *Xgwm371* locus: the 169 bp allele is associated with the ability to embryogenesis; the 185 bp allele — with the absence of such an ability or extremely low embryoid yield in the anther culture *in vitro*.

Keywords: wheat, *in vitro* anther culture, embryogenesis, double haploid lines, microsatellite loci.

Дата поступления в редакцию: 17 сентября 2021 г.

О. Д. Левданский, Р. С. Шулинский, Е. А. Мишук, Л. Н. Сивицкая

СРАВНЕНИЕ МЕТОДОВ ФАЗИРОВАНИЯ ГЕНОТИПОВ ДЛЯ ДАННЫХ ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ КЛИНИЧЕСКИХ ЭКЗОМОВ

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

Целью работы являлся поиск алгоритма фазирования экзомных NGS-данных, оптимального для анализа цис-/транс-положения близкорасположенных полиморфных локусов пациентов с наследственными заболеваниями. Были собраны данные высокопроизводительного секвенирования последовательностей клинического экзома 149 пациентов, проведена их первичная обработка. Создана комбинированная референсная выборка «Belref1000G» для фазирования и импутирования путем дополнения выборки проекта «1 000 геномов» 131-им образцом белорусских пациентов. Определены наиболее эффективные методы фазирования: наибольшую точность фазирования данных клинических экзотов жителей Беларуси позволяет достичь онлайн-сервис Michigan Imputation Server. В случае, когда онлайн формат фазирования по каким-либо причинам не подходит, рекомендуется использовать программу Beagle с комбинированной референсной панелью «Belref1000G». Для получения наиболее протяженных блоков фазирования стоит применять программу Beagle с референсной панелью «1000G».

Ключевые слова: фазирование генотипов, биоинформатический анализ данных высокопроизводительного секвенирования.

Введение

В последнее время все более активно развиваются так называемые «омиксные» технологии. Использование современных подходов в геномике, протеомике, транскриптомике и метаболомике позволяет генерировать огромные массивы данных, обработка которых без использования актуальных информационных технологий не представляется возможной. Доступный арсенал биоинформатических инструментов позволяет не только анализировать такие массивы экспериментальных данных за относительно короткое время, но и делает возможным их дополнение, например, с помощью импутирования. Таким образом, биоинформатические программы постепенно превращаются из инструмента для обработки результатов экспериментов в самостоятельные подходы к поиску новых знаний.

Данные, получаемые в результате высокопроизводительного секвенирования (NGS) на приборах компании Illumina (MiSeq, NextSeq др.), представляют собой огромное количе-

ство коротких перекрывающихся прочтений выбранных исследователем участков ДНК. Результатом обработки этих данных является vcf-файл, представляющий собой таблицу, включающую информацию о нуклеотидных заменах (SNP) и indel-полиморфных локусах (indels) в определенных позициях в геноме. Полученные в результате секвенирования короткие прочтения зачастую затруднительно собрать в отдельные группы сцепления. Поэтому были разработаны методики статистического фазирования vcf-файлов, которые основываются на сравнении представленности комбинаций аллелей, определяемой для каждой пары нуклеотидных позиций образца через соотношение гетеро- и гомозиготных генотипов в этих позициях в определенной выборке, называемой референсной. Результат фазирования в значительной степени зависит от качественного (как сильно популяция, из которой был взят фазируемый образец, отличается от «популяции» выборки) и количественного состава референсной выборки.

Исходя из вышесказанного, актуальность разработки оптимального алгоритма фазирования экзомных данных не вызывает сомнения. Информацию о цис-/транс- положении нуклеотидных вариантов сложно переоценить — популяционные и эволюционные исследования базируются на знании гаплотипов образцов; при наличии вероятно патогенных мутаций в гене, связанном с рецессивным заболеванием, проводится анализ положения вариантов на хромосомах посредством семейного анализа. Фазирование данных позволит в некоторых случаях избегать необходимости проведения дополнительных процедур, таких как анализ наследования прямым секвенированием родителей пациента. Кроме того, фазирование в качестве дополнительного источника информации поможет принимать более взвешенное решение о патогенности/взаимном влиянии вариантов на функции гена/РНК/белка, и, в конечном итоге, на фенотип.

Таким образом, целью данного исследования являлся поиск алгоритма фазирования экзомных NGS-данных, оптимального для анализа цис-/транс- положения близкорасположенных полиморфных локусов пациентов с наследственными заболеваниями.

Материалы и методы

В качестве объекта исследования были использованы данные NGS последовательностей клинических экзомов 95 жителей Беларуси, полученные с использованием панели TruSight One на приборе NextSeq 550 Sequencing System (Illumina Inc., San Diego, CA, USA), а также образцы ДНК 18 триад образцов пробанд-родители. Для оценки эффективности фазирования разными методами было проведено NGS 18 триад образцов пробанд-родители на приборе NextSeq 550 Sequencing System (Illumina Inc., San Diego, CA, USA) с использованием набора NextSeq 500/550 High Output Kit v2.5 (300 циклов). Пробоподготовка осуществлялась с использованием реагентов Nextera DNA Flex Pre-Enrichment Library Prep and Enrichment Reagents, Nextera DNA Flex Pre-Enrichment Library Prep Reagents, TruSight One Expanded — Enrichment Oligos и IDT® for Illumina® Nextera™ DNA UD Indexes Set A согласно протоколу производителя.

Оценка качества прочтений проводилась

в FastQC [1]. Тримминг некачественных оснований в Trimmomatic [2]. Локальное картирование прочтений на референсный геном GRCh37 выполнялось в программе BWA [3]. Форматирование и сортировка бинарной карты выравнивания прочтений (BAM) выполнялись в программе Samtools [3]. Добавление имен образцов, библиотек и платформ проводилось с помощью программы AddOrReplaceReadGroups пакета GATK [4]. Далее соединялись файлы выравнивания пробанда, матери и отца в один bam файл, сортировались в samtools и проводился вызов SNP в программе HaplotypeCaller пакета GATK [4]. SNP в полученных vcf-файлах фильтровались по показателю качества и покрытия в bcftools [3].

Фазирование генотипов проводилось в двух программах: SHAPEIT [5, 6] и Beagle [7]. Все описанные ниже шаги будут одинаковы для этих программ. В качестве «референсного» фазирования пробанда использовался вариант, при котором доступно наибольшее количество информации, а именно фазирование с использованием информации о родителях пробанда и «1000G» панели. В качестве «исследуемых» фазирований пробанда мы использовали 4 варианта: фазирование на онлайн-ресурсе Michigan Imputation Server [8] с использованием «1000G» панели, фазирование на онлайн-ресурсе Michigan Imputation Server с использованием «HRC» панели, фазирование с использованием «1000G» панели и фазирование с использованием созданной в рамках данного исследования панели «Belref1000G».

Комбинированная референсная выборка «Belref1000G» была создана путем дополнения части референсной выборки «1000G», соответствующей последовательностям клинического экзома, 131-им образцом жителей Беларуси, фазированных в Beagle с использованием референсной выборки «1000G». В выборку были включены 18 пар родителей из секвенированных в рамках данного исследования триад, при их фазировании также использовались последовательности пробандов с указанием родственных связей. NGS-данные остальных включенных образцов были получены в рамках выполнявшихся в Институте генетики и цитологии заданий. Доступ к созданной комбинированной референсной выборке «Belref1000G» можно получить по

запросу в Институте генетики и цитологии НАН Беларуси.

Сравнение с «референсным» фазированием проводили в соответствии со следующими основными метриками:

1. Частота ошибки смены фазы (ОСФ) — количество ошибочных смен фазы, деленное на количество всех возможных (средняя по образцам и хромосомам).

2. Процент полностью фазированных SNP (средний по образцам и хромосомам).

Также мы оценивали число фазированных SNP, длинных, коротких и неустановленных ошибок смены фазы, количество SNP использованных для оценки (сумма по хромосомам и средние по образцам).

Построение графиков, расчеты и расчет статистики полученных результатов осуществляли с использованием интерпретируемого языка Python (библиотеки pandas, ArgumentParser, savgol_filter, matplotlib.pyplot, numpy, scipy), приведение всех vcf к общему формату осуществляли на языке bash, поскольку каждая программа имеет собственные отличительные особенности vcf-файла. Скрипты, разработанные в ходе данного проекта, можно найти по ссылке [9].

Результаты и обсуждение

Существенным отличием между геномными данными и данными клинических экзомов, очевидно, является фрагментированность последних, что делает показатель N50 длин гаплотипов (QAN50), являющийся одним из основных при определении эффективности

фазирования полногеномных данных [10], абсолютно неинформативным. Поскольку данные межэкзонных последовательностей отсутствуют, то нет никакой возможности определить взаимную локализацию отдельных экзонов и генов относительно друг друга, кроме тех случаев, когда межэкзонные участки по протяженности не превышают длину прочтения (150 п. н. в нашем случае). Исходя из этого вычисление QAN50 не проводилось.

Фазированные с помощью SHAPEIT и Beagle с учетом данных о последовательностях родительских образов генотипы пробандов служили в качестве «золотого стандарта» для каждой из программ соответственно при сравнении следующих методов фазирования:

– онлайн фазирование Eagle [11] с использованием в качестве референсной выборки «HRC»;

– онлайн фазирование Eagle с использованием в качестве референсной выборки «1000G»;

– офлайн фазирование SHAPEIT/Beagle без учета данных о последовательностях родительских образов с использованием в качестве референсной выборки «1000G»;

– без учета данных о последовательностях родительских образов с использованием в качестве референсной выборки комбинированной «Belref1000G».

Основные параметры эффективности фазирования для SHAPEIT данными методами представлены в таблице 1.

Как видно из таблицы, наибольшего количества фазированных SNP со значительным отрывом позволяет достигнуть SHAPEIT/«1000G»,

Таблица 1

Основные показатели эффективности фазирования при сравнении с триадами, фазированными в SHAPEIT

Метод	Eagle/«HRC»	Eagle/«1000G»	SHAPEIT/ «1000G»	SHAPEIT/ «Belref1000G»
Количество SNP	14 611	14 951	17 016	15 868
Доля фазированных SNP	0,86	0,87	0,97	0,90
Количество фазированных SNP	14 589	14 929	16 994	15 846
ОСФ	1 561	1 595	2 436	2 069

Окончание таблицы 1

Метод	Eagle/«HRC»	Eagle/«1000G»	SHAPEIT/ «1000G»	SHAPEIT/ «Belref1000G»
Длинные ОСФ	616	624	886	775
Точечные ОСФ	469	482	770	642
Неопределенные ОСФ	8	8	9	9
Частота ОСФ (%)	10,97	10,99	14,64	13,38

при этом и частота ОСФ для данного метода максимальна. Eagle же, наоборот, при меньшем количестве фазированных SNP (86–87% против 97% для SHAPEIT) позволяет достигнуть значительно более высокой точности (частота ОСФ 10,97–10,99% против 14,64% для SHAPEIT). Фазирование с использованием созданной комбинированной референсной выборки «Belref1000G» позволило достигнуть промежуточных показателей эффективности (90% фазированных SNP при 13,38% ОСФ).

При сравнении основных показателей эффективности фазирования генотипов по хромосомам, выявленный диапазон частот ОСФ для Eagle/«HRC» составил от 8,09% (хромосома 20) до 16,41% (хромосома 8), для Eagle/«1000G» — от 7,41% (хромосома 22) до 16,09% (хромосома 8). Для SHAPEIT/«1000G» показатель варьировал от 10,89% (хромосома 6) до 17,73% (хромосома 8). SHAPEIT/«Belref1000G» показал минимальную для отдельной хромосомы частоту — 7,33% (хромосома 22), максимальный же достиг 16,42% (хромосома 10). В целом для отдельных хромосом по показателю частоты ОСФ наблюдается картина, аналогичная таковой для абсолютных показателей (табл. 1). Для 8 хромосомы частота ОСФ является наиболее высокой, что может быть связано с относительно более высоким средним расстоянием между экзонами. Для остальных хромосом частота ОСФ в зависимости от использованного метода фазирования варьировала более заметно.

Показатель доли фазированных SNP, наравне с зависимостью от использованного метода фазирования, оказался в большей

степени привязан к конкретной хромосоме. Так, максимальные значения были получены для всех методов на хромосоме 21. Минимальные для Eagle — на хромосоме 16, для SHAPEIT — на хромосоме 19. В целом же тенденция, описанная для общих показателей, сохраняется и для отдельных хромосом — максимальные значения получены для метода SHAPEIT/«1000G», минимальные — для Eagle, SHAPEIT/«Belref1000G» занимает промежуточную позицию.

На рисунке 1 показано распределение точности фазирования SHAPEIT (вероятность того, что два соседних SNP окажутся в той же фазе, что и в «золотом стандарте») в зависимости от расстояния между двумя локусами. Орелом соответствующего цвета здесь и далее показана стандартная ошибка средней. Достигнуть точности в 90% позволил только Eagle с незначительным преимуществом «1000G» по сравнению с «HRC». Сопоставимый уровень точности сохраняется для локусов на расстоянии до 10 тыс. п. н. после чего начинает снижаться более значительно. Точность при использовании SHAPEIT не превышает 79% (для «Belref1000G») и 77% (для «1000G») для локусов на расстоянии более 1 тыс. п. н.

Что касается протяженности блоков фазирования, то здесь, за счет большего количества фазированных SNP, лидирует SHAPEIT в комбинации с «1000G» (рис. 2).

Основные параметры эффективности фазирования генотипов для Eagle указанными выше методами представлены в таблице 2.

Как следует из таблицы, наибольшее количество фазированных SNP достигается с помощью Eagle/«1000G», при этом и частота

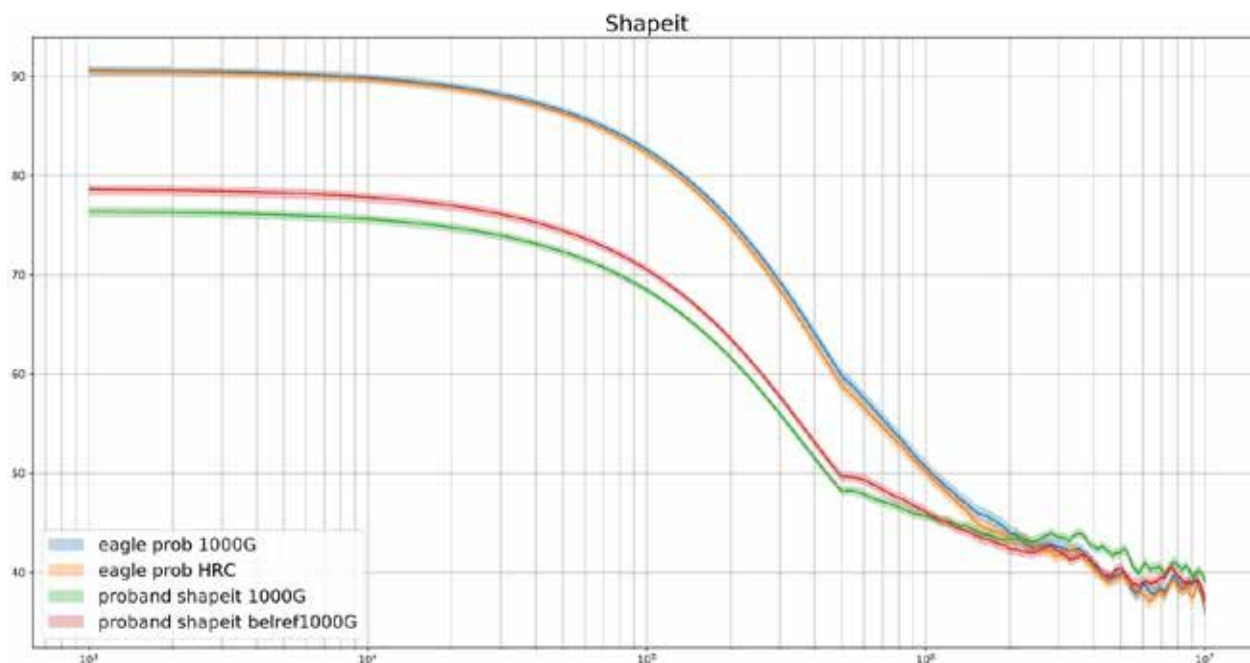


Рис. 1. Точность фазирования (%) в зависимости от расстояния между SNP (SHAPEIT)

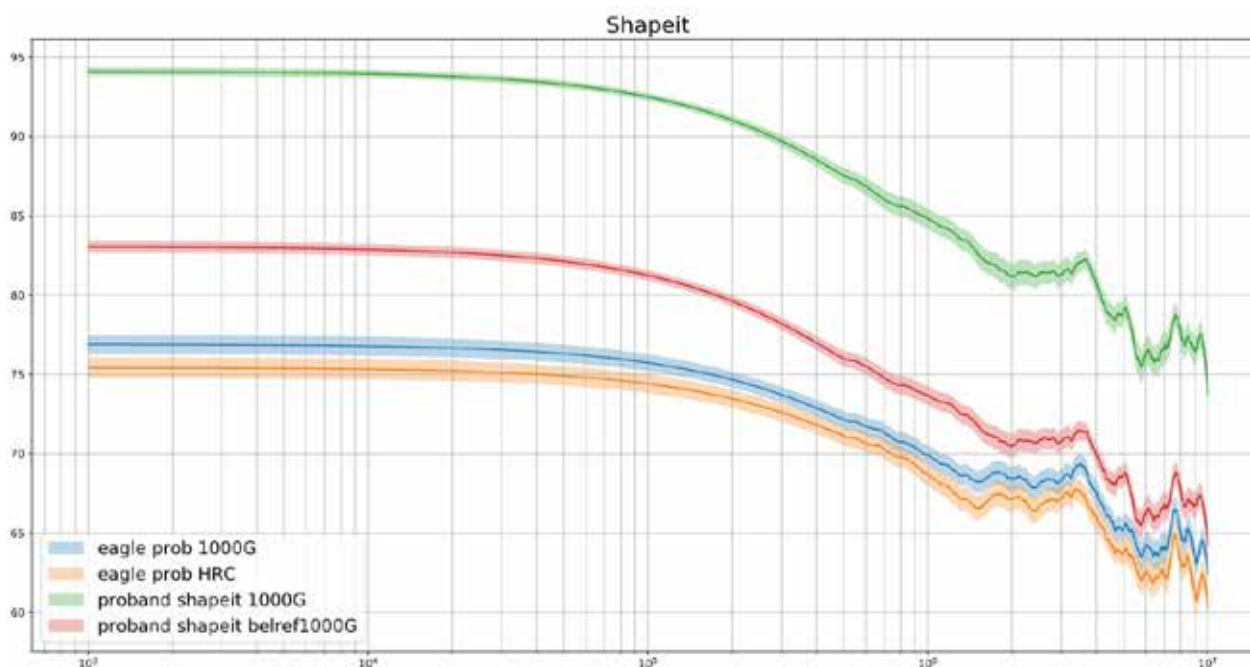


Рис. 2. Распределение вероятности того, что два фазированных SNP окажутся в одном блоке, в зависимости от расстояния между ними (SHAPEIT)

ОСФ для данного метода максимальна. Eagle же, наоборот, при меньшем количестве фазированных SNP (87–88% против 97% для Veagle), позволяет достигнуть более высокой точности (частота ОСФ 11,2–11,23% против 13,5% для Veagle). Фазирование с использованием комбинированной референсной выборки

«Belref1000G» дает промежуточные показатели эффективности (93% фазированных SNP при 12,83% ОСФ).

Для отдельных хромосом выявленный диапазон частот ОСФ для Eagle/«HRC» составил от 8,33% (хромосома 20) до 15,61% (хромосома 8), для Eagle/«1000G» — от 7,74% (хро-

Таблица 2

Основные показатели эффективности фазирования при сравнении с триадами, фазированными в SHAPEIT

Метод	Eagle/«HRC»	Eagle/«1000G»	SHAPEIT/ «1000G»	SHAPEIT/ «Belref1000G»
Количество SNP	14 333	14 721	16 616	15 861
Доля фазированных SNP	0,87	0,88	0,97	0,93
Количество фазированных SNP	14 311	14 699	16 594	15 839
ОСФ	1 572	1 607	2 203	1 996
Длинные ОСФ	610	618	790	740
Точечные ОСФ	478	491	702	624
Неопределенные ОСФ	8	8	8	8
Частота ОСФ (%)	11,23	11,20	13,5	12,83

мосома 20) до 15,19% (хромосома 8). Для Beagle/«1000G» показатель варьировал от 10,9% (хромосома 20) до 16,82% (хромосома 13). Beagle/«Belref1000G» показал минимальную частоту в 11,24% для хромосомы 20, максимальную в 16,51% для хромосомы 13. В целом для отдельных хромосом, как и в случае с SHAPEIT, распределение частот ОСФ соответствует таковому для абсолютных показателей (табл. 2). Также можно отметить, что для 20 хромосомы частота ОСФ является наиболее низкой, что может быть связано с относительно меньшим средним расстоянием между экзонами. Для остальных хромосом частота ОСФ в зависимости от использованного метода фазирования варьировала более заметно.

Показатель доли фазированных SNP, наравне с зависимостью от использованного метода фазирования, также в значительной степени варьировал для конкретных хромосом. Так, максимальные значения были получены для всех методов на хромосоме 21, кроме Beagle/«Belref1000G» (96,32% на хромосоме 20). Минимальные для Eagle и Beagle/«Belref1000G» — на хромосоме 16, для Beagle/«1000G» — на хромосоме 19. В це-

лом же тенденция, описанная для общих показателей, сохраняется и для отдельных хромосом — максимальные значения получены для метода Beagle/«1000G», минимальные — для Eagle, Beagle/«Belref1000G» занимает промежуточную позицию.

На рисунке 3 показано распределение точности фазирования для Beagle в зависимости от расстояния между двумя локусами. Достигнуть точности в 90%, как и в случае с SHAPEIT, позволил только Eagle, также с незначительным преимуществом «1000G» по сравнению с «HRC». Сопоставимый уровень точности сохраняется для локусов на расстоянии до 10 тыс. п. н. после чего начинает снижаться более значительно. Точность при использовании Beagle не превышает 84% (для «Belref1000G») и 83% (для «1000G») для локусов на расстоянии более 1 тыс. п. н.

Что касается протяженности блоков фазирования, то здесь, за счет большего количества фазированных SNP, лидирует Beagle в комбинации с «1000G» (рис. 4).

При сравнении результатов фазирования разными методами по хромосомам, можно сделать вывод, что наибольшая точность фази-

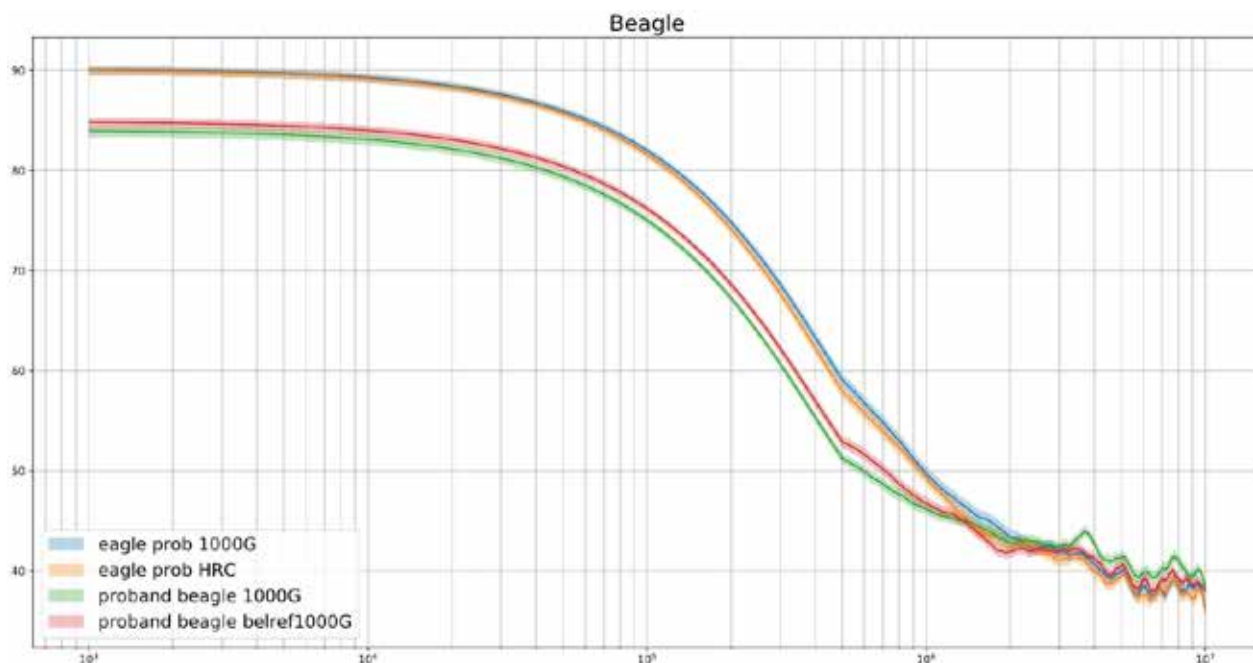


Рис. 3. Точность фазирования (%) в зависимости от расстояния между SNP (Beagle)

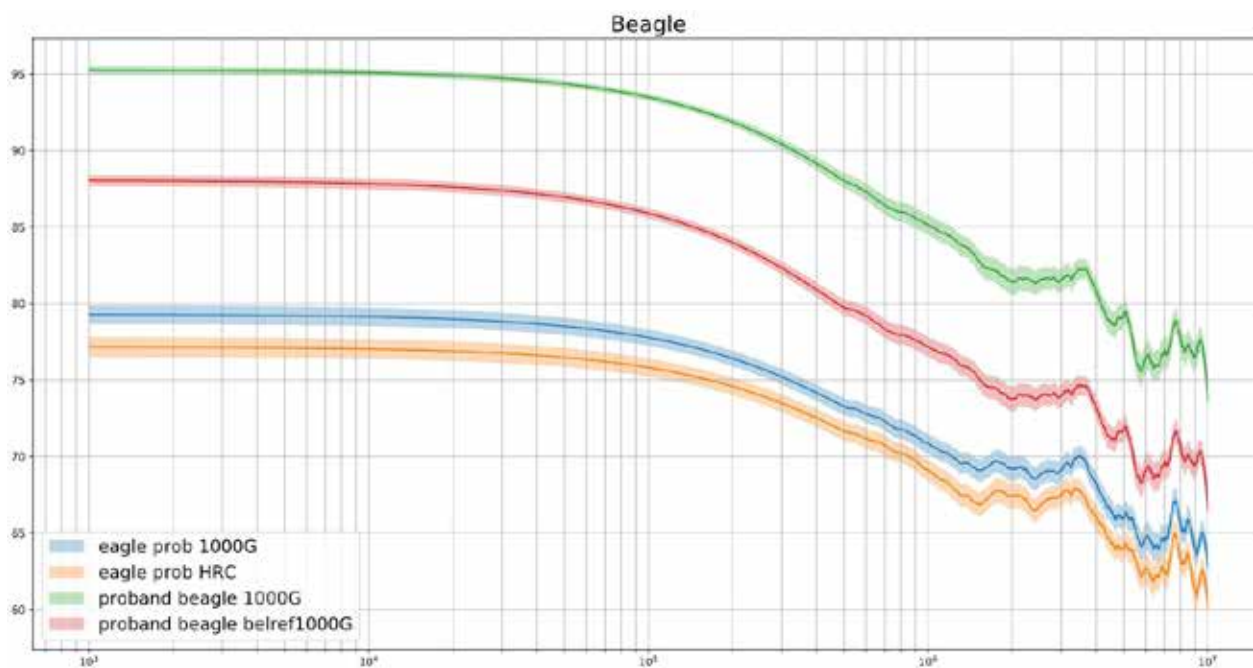


Рис. 4. Распределение вероятности того, что два фазированных SNP окажутся в одном блоке, в зависимости от расстояния между ними (Beagle)

рования достигается для локусов, расположенных на хромосомах 6, 19, 20 и 22, наименьшая — для 8 и 13 хромосомы. Полученные для 21 хромосомы результаты свидетельствуют о наибольшей доле фазированных SNP на ней. Это связано, по всей видимости, с особенностями панели клинического экзема, а точнее, с плотностью и распределением экзонов отобранных

для панели генов по хромосомам.

Кроме того, для двух вариантов фазирования триад (Beagle и SHAPEIT) было проведено сравнение распределения частоты ОСФ в зависимости от расстояния между SNP (рис. 5 и рис. 6). Как видно из распределения, средняя частота ошибки для двух вариантов фазирования с Eagle, как правило, ниже, чем

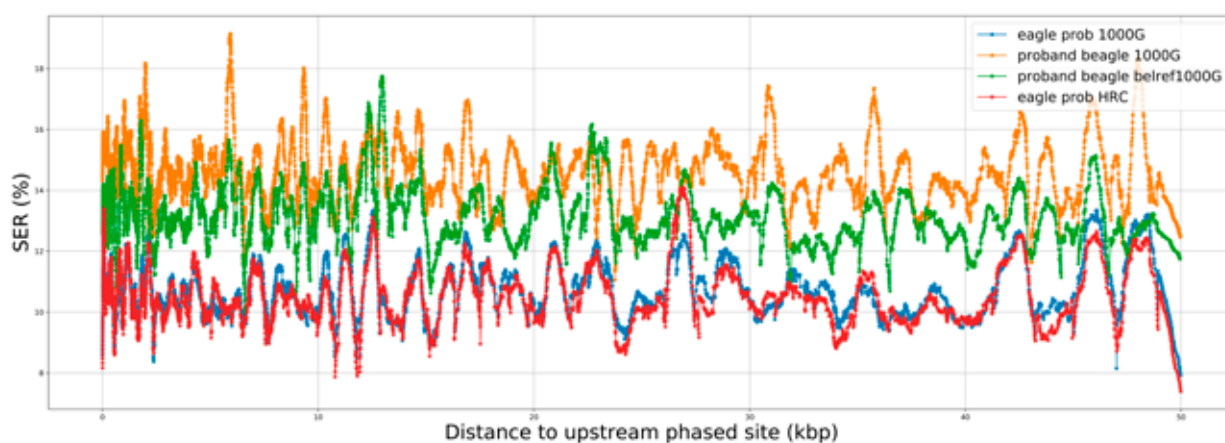


Рис. 5. Распределение частот ОСФ в зависимости от расстояния между SNP при фазировании Beagle

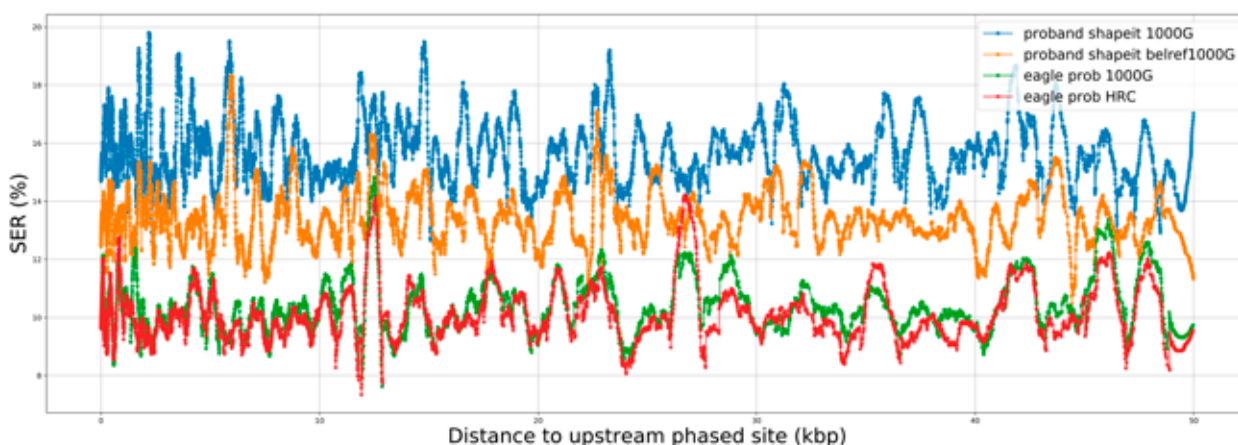


Рис. 6. Распределение частот ОСФ в зависимости от расстояния между SNP при фазировании SHAPEIT

для остальных вариантов. И, как в случае с остальными исследованными параметрами эффективности фазирования, использование комбинированной выборки Belref1000G дает промежуточный показатель эффективности между таковым для Eagle и выборкой 1000G.

Также можно отметить, что частота ОСФ не значительно меняется с ростом расстояния между SNP. Данный факт объясняется типом исходных данных: экзомные последовательности состоят из отдельных блоков, взаимное расположение которых определить невозможно.

Исходя из проведенных сравнений методов фазирования можно сделать следующие выводы, касающиеся их эффективности для данных последовательностей клинических экзотов жителей Беларуси:

- выбор конкретной программы для фазирования оказывает большее влияние на его эффективность, чем выбор референсной панели (при условии сопоставимых размеров

и качественного соответствия фазлируемому образцу);

- программа Eagle позволяет осуществлять более точное фазирование — в случае данных клинических экзотов до 90% для локусов, расположенных на расстоянии до 10 тыс. п. н., но с меньшим тотальным выходом;

- в случае, когда онлайн формат фазирования по каким-либо причинам не подходит, рекомендуется использовать программу Beagle с комбинированной референсной панелью «Belref1000G»;

- наибольшую протяженность блоков фазирования позволяет достигнуть Beagle — более 93% фазированных SNP, расположенных на расстоянии до 100 тыс. п. н., оказываются в одном блоке фазирования;

- созданная в рамках исследования комбинированная референсная панель «Belref1000G» позволяет снизить частоту ОСФ на 0,67% для Beagle и на 1,26% для SHAPEIT.

При сравнении полученных результатов с опубликованными в литературных источниках следует, в первую очередь, отметить, что практически все исследования в данной области проводились на данных секвенирования полных геномов. Однако, в целом, закономерности, показанные в рамках данной работы, согласуются с описанными в литературе. Так и выбор программы для фазирования, и тип, и размер используемой выборки способны оказать серьезное влияние на итоговую эффективность. Кроме того, зачастую она будет зависеть и от типа и качества исходных данных. Для дальнейшего повышения точности фазирования рекомендуется использовать данные секвенирования последовательностей геномов ближайших родственников, а также дополнительно использовать данные секвенирования с длинными прочтениями [10–13].

Заключение

Таким образом, в рамках данного исследования были собраны данные высокопроизводительного секвенирования последовательностей клинического экзема 149 пациентов, проведена их первичная обработка (перевод интенсивностей сигнала в нуклеотидные прочтения, оценка качества и очистка сырых последовательностей, выравнивание и вызов вариантов). Осуществлено фазирование собранных образцов различными методами. Создана комбинированная референсная выборка «Belref1000G» для фазирования и импутирования путем дополнения выборки проекта «1000 геномов» 131-им образцом белорусских пациентов.

Определены наиболее эффективные методы фазирования: наибольшую точность фазирования данных клинических экзотов жителей Беларуси позволяет достичь онлайн-сервис Michigan Imputation Server. В случае, когда онлайн формат фазирования по каким-либо причинам не подходит, рекомендуется использовать программу Beagle с комбинированной референсной панелью «Belref1000G». Для получения наиболее протяженных блоков фазирования стоит применять программу Beagle с референсной панелью «1000G».

Коллектив авторов выражает благодарность сотрудникам лаборатории экологиче-

ской генетики и биотехнологии Института генетики и цитологии НАН Беларуси Михаленко Е. П., Мазур О. Ч. и Малышевой О. М. за предоставленные данные NGS, а также Ермаковичу Д. П. за помощь в планировании исследования и обработке данных.

Работа выполнена в рамках ГПНИ «Биотехнологии» 2019–2020 гг., подпрограмма 2 «Структурная и функциональная геномика».

Список использованных источников

1. FastQC [Electronic resource]: The Babraham Bioinformatics group. – Mode of access: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/index.html> (дата обращения 12.01.2020).
2. Trimmomatic: A flexible read trimming tool for Illumina NGS data: RWTH Aachen University [Electronic resource]. – URL: <http://www.usadellab.org/cms/?page=trimmomatic> (дата обращения 12.01.2020).
3. Li H., Handsaker B., Wysoker A. The Sequence alignment/map (SAM) format and SAMtools // Bioinformatics. – 2009. – Vol. 25(16). – P. 2078–2079.
4. Genotype Analysis Toolkit: Broad Institute [Electronic resource]. – URL: <https://gatk.broadinstitute.org/hc/en-us> (дата обращения 12.01.2020).
5. SHAPEIT: University of Oxford [Electronic resource] – URL: https://mathgen.stats.ox.ac.uk/genetics_software/shapeit/shapeit.html (дата обращения 12.01.2020).
6. Delaneau O., Zagury J.-F., Marchini J. Improved whole-chromosome phasing for disease and population genetic studies // Nature Methods. – 2013. – Vol. 10. – P. 5–6.
7. Browning S. R., Browning B. L. Rapid and accurate haplotype phasing and missing data inference for whole genome association studies by use of localized haplotype clustering // Am J Hum Genet. – 2007. – Vol. 81. – P. 1084–1097.
8. Michigan Imputation Server: U. S. National Institutes of Health [Electronic resource]. – URL: <https://imputationserver.sph.umich.edu/index.html> (дата обращения 12.01.2020).
9. Phasing scripts. – URL: https://github.com/IGC-bioinf/phasing_scripts (дата обращения 15.12.2020).
10. Choi Y. [et al.] Comparison of phasing strategies for whole human genomes // PLoS Genet.

- ics. – 2018. – Vol. 14 (4). doi: 10.1371/journal.pgen.1007308.
11. Loh P.-R. [et al.] Reference-based phasing using the Haplotype Reference Consortium panel // Nature Genetics. – 2016. – Vol. 48(11). – P. 1443–1448.
12. Browning S. R., Browning B. L. Haplotype phasing: Existing methods and new developments // Nature Reviews Genetics. – 2012. – Vol. 12 (10). – P. 703–714.
13. Bkhetan Z. A. [et al.] Exploring effective approaches for haplotype block phasing // BMC Bioinformatics. – 2019. – Vol. 20. doi: 10.1186/s12859-019-3095-8.

A. D. Liaudanski, R. S. Shulinski, Y. A. Mishuk, L. N. Sivitskaya

COMPARISON OF GENOTYPE PHASING METHODS FOR THE HIGH THROUGHPUT SEQUENCING DATA OF CLINICAL EXOMES

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: o.liaudanski@igc.by

The aim of this investigation was to search for an algorithm for phasing of exome NGS data that would be optimal for analyzing the cis-/transposition of closely located polymorphic loci in patients with hereditary diseases. The NGS data on clinical exome sequences from 149 patients was collected and analyzed, and its primary processing was carried out. A combined reference panel for phasing and genotype imputation “Belref1000G” was created by adding 131 samples of Belarusian patients to the panel from the “1000 Genomes” project. The most effective methods of phasing have been determined: the Michigan Imputation Server (online service) allows achieving the highest accuracy of phasing data from clinical exomes in Belarus. In cases where an online format of phasing is not appropriate for whatever reason, Beagle software with the combined reference panel “Belref1000G” is recommended for use. Beagle software with the “1000G” reference panel should be used to obtain the longest phasing blocks.

Keywords: genotypes phasing, bioinformatic analysis of high throughput sequencing data.

Дата поступления в редакцию: 09 сентября 2021 г.

А. Н. Заинчковская¹, Е. П. Хмилевская¹, А. М. Шишлова-Соколовская¹, С. В. Косьяненко²,
Е. А. Фомина¹, О. Ю. Урбанович¹

ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ ЛИНИЙ КУР БЕЛОРУССКОЙ СЕЛЕКЦИИ ПО АЛЛЕЛЬНОМУ СОСТАВУ ГЕНОВ *PRL*, *GH* И *IGF-I*, АССОЦИИРОВАННЫХ С ПРОДУКТИВНОСТЬЮ

¹Государственное научное учреждение
«Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси»
Республика Беларусь, 220072, г. Минск, ул. Академическая, 27

e-mail: annazainchkovskaya@mail.ru

²Республиканское дочернее унитарное предприятие
«Опытная научная станция по птицеводству»

Республика Беларусь, 223036, г. Заславль, ул. Юбилейная, 2а

Определена генетическая структура популяций кур линии К₁ породы род-айленд красный и линии Б(5) породы белый леггорн белорусской селекции по 24 InDel и C-2402T полиморфизмам гена пролактина *PRL*, *MspI* полиморфизму в 1 и 4 интронах гена гормона роста *GH*, а также *HinfI* полиморфизму гена инсулиноподобного ростового фактора I *IGF-I*. Показано, что петушки и курочки линии Б(5) породы белый леггорн яичной продуктивности и линии К₁ породы род-айленд красный яично-мясной продуктивности различаются по частоте встречаемости аллелей исследуемых генов. У представителей линии Б(5) породы белый леггорн наибольшее распространение получили аллели генов *PRL* и *GH*, ассоциированных с повышенной яйценоскостью. Полученные данные можно использовать для направленной селекции кур исследуемых линий.

Ключевые слова: курица, полиморфизм, молекулярные маркеры, гены-кандидаты, *PRL*, *GH*, *IGF-I*.

Введение

Птицеводство является одним из важнейших направлений сельского хозяйства [1, 2], в том числе и в Республике Беларусь. На белорусских птицефабриках и в домашних хозяйствах разводят несколько видов, пород и кроссов домашней птицы, мясо и яйца которых являются одним из основных источников животного белка для населения страны [1, 2]. По последним данным Национального статистического комитета Республики Беларусь (июль 2021) в структуре реализации скота и птицы на убой в живом весе на долю птицы приходилось 39,5%. В республике за последний год было произведено 3 494,6 млн. штук яиц [3]. Селекция птицы и, в частности, кур, имеет важное значение для нашей страны [2].

В связи с достижениями мировой науки в области молекулярной генетики кур, в том числе полученными данными об их геноме [4], актуальным становится изучение генетического потенциала данной птицы непосредственно по генам, влияющим на хозяйствен-

но-ценные признаки с целью создания пород различных направлений продуктивности, таких как яичная, мясная, яично-мясная и мясо-яичная [5, 6]. Изучение ассоциации различных аллелей функциональных генов с хозяйственно-ценными признаками является существенным в современной селекции птицы. Данные исследования относятся к одной из составляющих МАС (маркер-ассоциированная селекция) в животноводстве, основой которого служит изучение связи полиморфных вариантов целевых генов или фрагментов генома организма с хозяйственно-ценными признаками. Применение данного подхода позволяет повысить эффективность селекционного процесса кур [7–10]. Наиболее перспективными генами-кандидатами, оказывающими влияние на показатели продуктивности, являются гены пролактина (*PRL*), гормона роста (*GH*), инсулиноподобного ростового фактора I (*IGF-I*) [11].

Однонуклеотидная замена во втором экзоне гена пролактина (*PRL*) оказывает влияния

на показатели живой массы у кур при наступлении половозрелого возраста, а замена в пятом экзоне — на яйценоскость. Найдена связь полиморфизма С/Т в пятом экзоне гена пролактина с яйценоскостью и массой птицы и у гусей. Показано влияние на продуктивные показатели кур С/Т локуса, расположенного в 5'-нетранслируемой области гена пролактина [12]. Также выявлено несколько мутаций в промоторной области данного гена, которые положительно связаны с интенсивностью яйцекладки кур, а также наблюдаемым проявлением насиживаемости [13].

Ген гормона роста (соматотропин, *GH*) является одним из важных в селекционном разведении и в птицеводстве, так как его аллельные варианты связаны с различными признаками продуктивности у кур. Соматотропин синтезируется аденогипофизом, относится к пептидным гормонам и участвует в обеспечении самого широкого спектра физиологических функций, к которым в основном относятся рост и дифференцировка тканей. Кроме того, указанный гормон регулирует активность других гормонов, например, оказывает влияние на синтез инсулиноподобного фактора роста I. Было показано, что соматотропин является мощным модулятором роста и дифференцировки как мужских, так и женских гонад, а также участвует в контроле пролиферации, стероидогенеза и апоптоза в нескольких репродуктивных процессах, действуя как эндокринный или аутокринный/паракринный регулятор [14].

Инсулиноподобный ростовой фактор I (*IGF-I*) представляет собой сложный пептидный гормон, который связывается с рецептором *IGFIR* и оказывает влияние на внутреннюю активность домена тирозинкиназы. Действие гормона вызывает биологические ответы, которые влияют на рост, пролиферацию, дифференциацию и выживаемость клеток в условиях апоптоза. Ген *IGF-I* может влиять на скорость роста и липидный обмен у домашней птицы [7, 9].

Определение полиморфизмов генов-кандидатов, аллельные варианты которых связаны с проявлением показателей таких хозяйственно-полезных признаков, как яйценоскость и мясные качества, относится к актуальным вопросам в отечественной селекции кур.

Представленное исследование направлено на изучение особенностей генетической структуры двух линий кур белорусской селекции по указанным генам.

Материалы и методы

Биологический материал был передан РУП «Опытная научная станция по птицеводству». Птица содержалась в отделении «Племптицецеховод «Белорусский» ОАО «1-я Минская птицефабрика». Для исследований отобран биоматериал у суточных петушков и курочек отцовских яичных линий Б(5) породы белый леггорн, а также яично-мясной линии К₁ породы род-айленд красный.

Выделение ДНК из животных тканей осуществляли с использованием набора «Genomic DNA Purification Kit» (Thermo Fisher Scientific, EU) с помощью протокола производителя, оптимизированного нами под исследование.

Полиморфизм генов изучали с помощью PCR и PCR-RFLP маркеров. Определяли наличие: инсерции 24 п. н. в промоторном участке гена пролактина; транзиции цитозина в тимин в положении 2402–PRLC2402T данного гена; *MspI* полиморфизма в 1 и 4 интронах гена гормона роста; *HinfI* полиморфизма в промоторном участке гена инсулиноподобного ростового фактора I. Праймеры и их температура отжига, а также использованные эндонуклеазы рестрикции приведены в таблице 1.

Молекулярно-генетический анализ

Состав реакционной смеси для амплификации объемом 25 мкл был следующий: 10 × буфер для *Taq*-полимеразы с $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 2,5 мМ MgCl_2 ; 0,2 мМ dNTP; 0,2 мкМ праймеров; 1 ЕА *Taq*-полимеразы (Thermo Fisher Scientific, EU); 20 нг ДНК. Для анализа использовались праймеры производства компании ООО «АртБиоТех» (Минск). Условия ПЦР: I-й этап: 1 цикл: 94 °С — 4 мин; II-й этап: 35 циклов: 94 °С — 1 мин; T_m для каждой пары праймеров приведены в таблице 1 — 1 мин; 72 °С — 1 мин; III-й этап: 1 цикл: 72 °С — 7 мин.

Ферментативное расщепление амплифицированного фрагмента ДНК проводили с использованием буфера 10 × Bufferwitch BSA (ThermoFisherScientific, EU) и эндонуклеаз рестрикции (Thermo Fisher Scientific, EU) по протоколу, рекомендованному производителем. Рестрикционная смесь разделялась по-

Таблица 1

Названия праймеров, температура отжига праймеров (T_m) в °С, эндонуклеазы рестрикции, название аллеля и относительные размеры продуктов амплификации/рестрикции

Локус	Название праймеров	T_m	Эндонуклеаза рестрикции	Аллель, продукт амплификации/рестрикции, в п. н.	Литература
PRL24 InDel	24BP	54		I — 154; D — 130	[15]
PRLC-2402T	5FA	62	<i>AluI</i>	C — 160/144/81/54; T — 304/81/54	[15]
GH1in	PM3	59	<i>MspI</i>	A — 539/237; B — 392/237/147; C — 267/237/147/125	[16]
GH4inMspI	PS1	61	<i>MspI</i>	A — 1200; B — 600/600; C — 500/700	[16]
IGF-Ipr	IGF-I	57	<i>HinfI</i>	C — 622/191; A — 378/244/191	[17]

средством электрофореза в 4% агарозном геле.

Статистический анализ

Частота встречаемости аллелей рассчитывалась как отношение доли каждого аллеля к общему количеству аллелей.

Результаты и обсуждение

Для изучения генетической структуры кур белорусской селекции отцовских линий был отобран биоматериал у 50 курочек и 40 петушков линии K_1 породы род-айленд красный, а также 39 курочек и 39 петушков линии Б(5) породы белый леггорн. Полиморфизм генов *PRL*, *GH*, *IGF-I* изучали с помощью молекулярно-генетических PCR-RFLP маркеров, указанных в таблице 1.

При исследовании 24 InDel полиморфизма промоторной области гена пролактина *PRL* в выборке птиц яичной направленности породы белый леггорн линии Б(5) наблюдали преобладание аллеля I. У 2 курочек была установлена делеция (D аллель) в данной области. Частота встречаемости I аллеля составила 0,974; частота встречаемости D аллеля

— 0,026 (табл. 2). В исследуемой выборке все особи по данному локусу оказались гомозиготами. I аллель положительно коррелирует с интенсивностью яйценоскости. Результаты показывают, что при создании линии Б(5) селекция велась в направлении сохранения данного аллеля в популяции. Преобладание I аллеля также было показано в других исследованиях на породах кур яичной направленности [18–22]. Это подтверждает важность его сохранения в линиях кур, ориентированных на повышенную яйценоскость [23].

У птицы яично-мясной направленности линии K_1 породы род-айленд красный в указанной области присутствовал аллель D, ассоциированный с проявлением насиживаемости (табл. 2). Этот локус для данной линии оказался мономорфным. Анализ литературных данных показывает, что преобладание данного аллеля характерно для линии 38 кур данной породы [13], а также кур линии Г2 породы Плимутрок белый украинской селекции [24], локальной популяции кур Папуа в Индонезии [25], аборигенной популяции кур во Вьетна-

Таблица 2
Частоты встречаемости аллелей генов *PRL*, *GH*, *IGF-I* в линиях кур Б(5) породы белый леггорн и К₁ породы род-айленд красный

Локус	Линия кур	
	линия Б(5)	линия К1
PRL24 Indel	0,974 (I) 0,026 (D)	0 (I) 1 (D)
PRLC-2402T	1(C) 0 (T)	0,355 (C) 0,645 (T)
GH1in	1 (A) 0 (C)	0,805 (A) 0,195 (C)
GH4inMspI	0,795 (A) 0 (B) 0,205 (C)	0,110 (A) 0,245 (B) 0,645 (C)
IGF-Ipr	0,510 (A) 0,490 (C)	0,680 (A) 0,320 (C)

ме [26] и др. В исследованиях, проведенных на популяции кур породы полтавская глинистая линии 14 яично-мясного направления продуктивности, локус PRL (24indel) также оказался мономорфным и содержал только аллель D [23].

По наличию С-2402Т полиморфизма в гене *PRL* между исследуемыми линиями кур также наблюдались значительные различия. Линия кур К₁ характеризуется наличием большого количества гетерозигот — 51,1%, в отличие от кур линии Б(5), которые оказались гомозиготами по указанному локусу и несут только аллель С (табл. 2). Частота встречаемости аллеля С у кур линии К₁ составляет — 0,355; Т — 0,645. Замена тимина на цитозин ассоциирована с увеличением яйценоскости [6]. В этой связи закономерно присутствие аллеля С в линии Б(5). Преобладание С аллеля для породы белый леггорн было показано J.-X. Cui et al. [15] и А. А. Al-Sheikh, I. H. Ismail [27].

Распространение Т аллеля характерно для особей кур с яично-мясным направлением продуктивности. Это объясняет его значительную долю в популяции кур линии К₁. Превалирование аллеля Т наблюдается также и среди особей линии 38 данной породы украинской селекции [13]. В более ранних исследованиях на других породах и линиях кур яично-мясного и мясного направления также было показа-

но преобладание аллеля Т над С [15, 26, 28]. При этом часть особей оказывается гетерозиготными. Отмечен довольно высокий уровень гетерозиготности (44%) среди аборигенных кур провинции Западный Азербайджан, Иран [29], кур ‘Zo-ar’ из Мизорама, Индия — 56% [30] и аборигенных кур провинции Мазандаран, Иран — 84% [22].

Если сравнивать кур белорусской селекции линии К₁ породы род-айленд красный яично-мясного направления, линии Б(5) породы белый леггорн яичной продуктивности с курами украинской селекции породы борковская барвистая (линия А) яичной направленности продуктивности по двум локусам гена пролактина, то можно отметить, что для нее характерно преобладание аллелей I и С. Однако в популяциях кур мясного и яично-мясного направления продуктивности превалирование данных аллелей не наблюдается. Такое распределение аллелей отражает эффект от проводимой селекционной работы. Полученные данные подтверждаются работами других авторов об упомянутой выше связи аллелей I и С с показателями яичной продуктивности у кур разных пород [15, 31–34], что положительно коррелирует с результатами, полученными в данном исследовании.

Анализ распространения аллелей гена пролактина среди петушков и курочек показы-

вает, что у особей обоих полов наблюдаются некоторые различия по составу аллелей (рис. 1). В локусе PRL 24InDel у курочек породы белый леггорн обнаружены носители аллеля D. В локусе PRLC2402T у курочек породы род-айленд красный с большей частотой представлен генотип T/T.

В ходе молекулярно-генетического изучения

MspI полиморфизма в 1 интроне гена гормона роста *GH* исследованных линий кур яичной продуктивности мы наблюдали полное доминирование аллеля А (табл. 2). По результатам исследований зарубежных авторов, аллель С полностью отсутствует в коммерческих линиях кур яичной продуктивности, однако присутствует у некоторых аборигенных пород

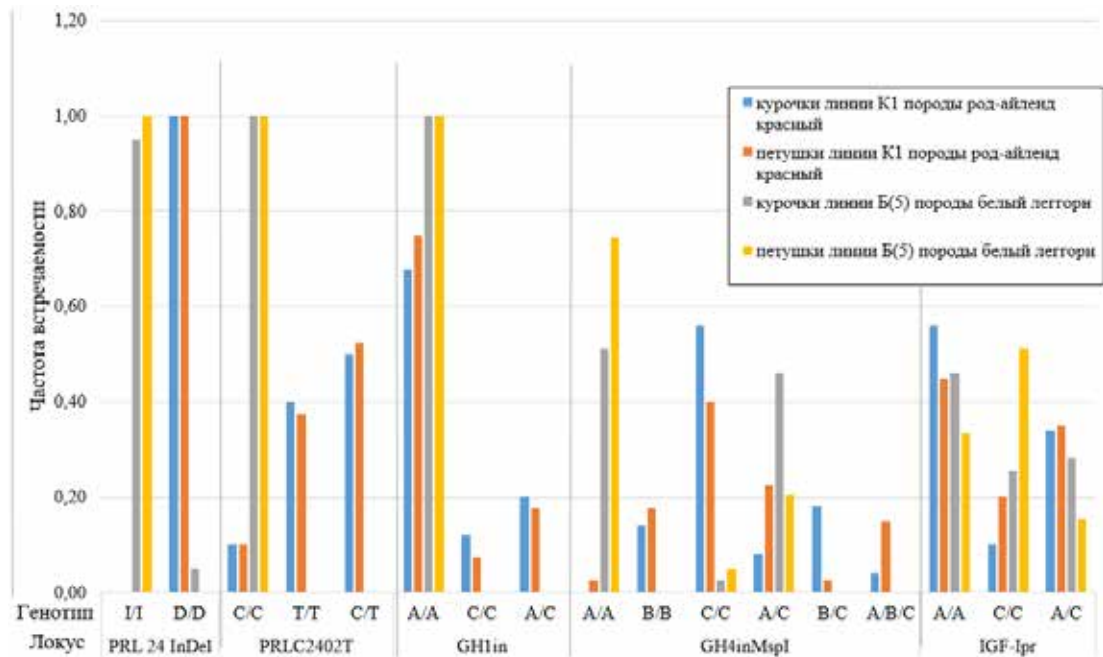


Рис.1. Частота встречаемости аллелей генов *PRL*, *GH*, *IGF-I* в геноме петушков и курочек линий B(5) породы белый леггорн и K₁ породы род-айленд красный

[35, 36]. При генотипировании отечественных кур линии K₁ в данном локусе были идентифицированы аллели А и С. Аллель В в указанных генотипах выявлен не был. Частота встречаемости аллеля А составила 0,805, аллеля С — 0,195 (табл. 2). Похожие частоты встречаемости для линий кур данной породы польской селекции были выявлены В. Wardęcka et al. [37]. Однако в исследованиях Р. А. Кулибабы с соавт. линии 38 кур породы род-айленд красный украинской селекции было отмечено преобладание аллеля С [6], тогда как в нашем исследовании в линии K₁ его частота невелика. Вероятно, различия по аллельному составу между исследованными линиями данной породы обусловлены различными селекционными подходами.

По *MspI* полиморфизму в 4 интроне гена *GH* распределение частот аллелей у исследованных линий кур с различными направлени-

ями продуктивности значительно отличалось. Так, у кур породы белый леггорн линии B(5) в данном локусе преобладал аллель А, частота встречаемости которого составила 0,795. Аллель С в указанной линии присутствовал с частотой 0,205, аллель В выявлен не был. В геномах кур линии K₁ породы род-айленд красный были выявлены все три описанных в литературе вида аллелей указанного локуса — А, В и С, частота встречаемости которых составила 0,110, 0,245 и 0,645 соответственно (табл. 2). С проявлением высокой яйценоскости ассоциирован аллель А, и именно он с наибольшей частотой встречается в линии B(5). Схожая частота встречаемости аллеля А (0,75) была показана в других исследованиях для кур породы борковская барвистая яичного типа [6]. Данный аллель также доминировал в геноме аборигенных кур селекционного центра Фарс, Иран [38]. Аллель С чаще преобладает

в геноме кур мясо-яичной продуктивности [6, 39], однако может преобладать и у яичных пород [40], что вероятнее всего связано с различиями в методах селекции. Состав аллелей гена *GH* у петушков и курочек обеих пород имел некоторые различия (рис. 1).

По наличию *HinfI* полиморфизма инсулиноподобного ростового фактора I в выборке линии Б(5) распределение аллелей А и С было практически равным. Частота аллеля А составила 0,510, аллеля С — 0,490 (табл. 2). Схожее распределение частот аллелей А и С (0,48 и 0,52 соответственно) наблюдалось и при исследовании кур породы белый леггорн азиатской селекции [41]. У линии кур К₁ по указанному полиморфизму наблюдалось превалирование аллеля А, частота встречаемости которого составила 0,680, в то время как аллеля С — 0,320. В целом в описанных в литературе исследованиях преобладание аллеля А было установлено для кур мясной продуктивности [17, 41–46]. Аллель А доминировал среди кур линии Г-2 породы плимутрок белый, относящейся к мясо-яичному типу [6]. Незна-

чительное преобладание аллеля А было выявлено в геноме аборигенных кур в Иране [47]. Доминирование аллеля С также было установлено в исследованиях для аборигенных кур Тайланда [48, 49], для кур линии 38 породы род-айленд красный, а также кур яичного (борковская барвистая, линия А) и яично-мясного (полтавская глинистая, линия 14) направления украинской селекции [6].

На основе полученных данных о составе аллелей генов *PRL*, *GH*, *IGF-I* был проведен анализ генетической структуры исследуемых популяций линий кур белорусской селекции с использованием метода Evanno [48]. Результаты проведенного анализа отображены на рисунке 2.

С использованием алгоритма программы Structure было выявлено, что исследуемые линии кур оптимально разделяются на 2 кластера в соответствии с их типом продуктивности, а именно — кластер яично-мясной линии К₁ породы род-айленд красный и кластер яичной линии Б(5) породы белый леггорн. При этом существенных различий между петушками

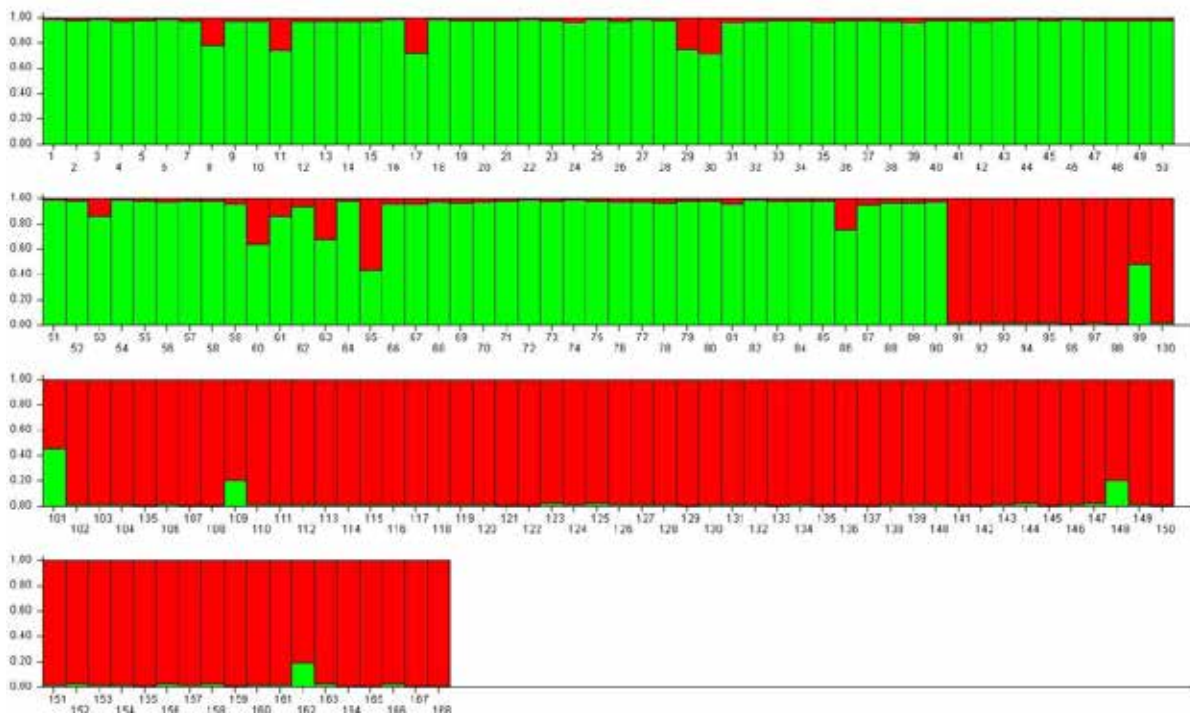


Рис.2. Результаты кластеризации петушков и курочек линий белорусской селекции по данным о составе аллелей генов *PRL*, *GH*, *IGF-I*, полученные с помощью программы Structure v. 2.3.4 (K = 2)
 1–50 столбцы — курочки линии К₁ породы род-айленд красный; 51–90 столбцы — петушки линии К₁ породы род-айленд красный; 91–129 столбцы — курочки линии Б(5) породы белый леггорн; 130–168 столбцы — петушки линии Б(5) породы белый леггорн.

и курочками одной линии не было выявлено. Были обнаружены отдельные особи с неоптимальным составом аллелей для своего типа продуктивности. Таким образом, результаты показывают, что селекционный процесс в рамках двух пород способствовал сохранению и закреплению у линий кур белорусской селекции аллелей генов, ассоциированных с их типом продуктивности.

Заключение

В целом полученные данные о полиморфизме аллелей генов *PRL*, *GH*, *IGF-I* кур линий Б(5) породы белый леггорн и К₁ породы род-айленд красный белорусской селекции показывают, что генетическая дифференциация популяций кур по совокупности изученных полиморфных локусов отражает их тип продуктивности. Показано, что исследованные линии кур белорусской селекции различаются по частоте встречаемости аллелей генов, ассоциированных с яйценоскостью. Наличие генетической изменчивости внутри пород позволяет вовлекать их в направленную селекционную работу с использованием молекулярно-генетических маркеров. Полученные данные можно в дальнейшем использовать для направленной селекции кур исследуемых линий с целью получения потомства от желательных генотипов, что в сочетании с классическими селекционными методами позволит максимально эффективно раскрыть продуктивный потенциал птицы.

Список использованных источников

1. Genetic structure of a wide spectrum chicken gene pool / Z. Granevitze [et al.] // *Animal Genetics*. – 2009. – Vol. 40, № 5. – P. 686–693.
2. Косьяненко, С. В. Совершенствование кроссов сельскохозяйственной птицы отечественной селекции / С. В. Косьяненко // *Весті Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Серыя аграрных навук*. – 2015. – № 4. – С. 80–86.
3. Сельское хозяйство Республики Беларусь : статистический сборник / Национальный статистический комитет Республики Беларусь, Государственный комитет по имуществу Республики Беларусь ; редкол.: И. В. Медведева [и др.]. – Минск : Информационно-вычислительный центр Национального статистического комитета Республики Беларусь, 2021. – 179 с.
4. A new chicken genome assembly provides insight into avian genome structure / W. C. Warren [et al.] // *G3-Genes Genomes Genetics*. – 2017. – Vol. 7, № 1. – P. 109–117.
5. Third report on chicken genes and chromosomes / M. Schmid [et al.] // *Cytogenetic and Genome Research*. – 2015. – Vol. 145. – P. 78–179.
6. Кулибаба, Р. А. Генетическая дифференциация пород кур украинской селекции с использованием различных типов молекулярно-генетических маркеров / Р. А. Кулибаба, Ю. В. Ляшенко, П. С. Юрко // *Сельскохозяйственная биология*. – 2018. – Т. 53, № 2. – С. 282–292.
7. Кулібаба, Р. О. Аналіз зв'язку алельних варіантів генів *IGF-I*, *GH* та *PIT-1* з продуктивними ознаками курей породи бірквіська барвіста / Р. О. Кулібаба // *Науковий вісник ЛНУВМБ імені С. З. Гжицького*. – 2017. – Т. 19, № 79. – С. 53–57.
8. Кулибаба, Р. А. *MspI*-полиморфизм четвертого интрона гена гормона роста в популяциях кур различных пород. Анализ причин возникновения дополнительного паттерна рестрикции / Р. А. Кулибаба, П. С. Юрко, Ю. В. Ляшенко // *Цитология и генетика*. – 2015. – Т. 49, № 6. – С. 30–37.
9. Insulin-like growth factor I gene polymorphism associated with growth and carcass traits in Thai synthetic chickens / N. Promwatee [et al.] // *Genetics and Molecular Research*. – 2013. – Vol. 12, № 4. – P. 4332–4341.
10. Polymorphisms in the 5'-flanking regions of the *GH*, *PRL*, and *Pit-1* genes with Muscovy duck egg production / D. X. Zhang [et al.] // *Journal of Animal Science*. – 2015. – Vol. 93, № 1. – P. 28–34.
11. Кулибаба, Р. А. Связь функционального полиморфизма целевых генов (*PRL*, *GH*, *GHR*) с продуктивными признаками яичных кур украинской селекции / Р. А. Кулибаба // *Генетика и разведение животных*. – 2015, № 3. – С. 75–80.
12. The novel genetic change in 5'-untranslated region of goose prolactin gene and their distribution pattern in different goose breeds / H. Q. Chen [et al.] // *Asian J. Anim. Vet. Adv.* – 2011. – Vol. 6. – P. 1069–1075.
13. Shulika, L. V. Genetic structure of Rhode-Island Red chicken breed population on *PRL* and *INS* loci. Associations between genotype and

- chicken productivity / L. V. Shulika, R. O. Kuli-baba // *Archiva Zootechnica*. – 2018. – Vol. 21, № 1. – P. 51–59.
14. Extrapituitary growth hormone in the chicken reproductive system / M. Luna [et al.] // *General and Comparative Endocrinology*. – 2014. – Vol. 203. – P. 60–68.
15. Association of polymorphisms in the promoter region of chicken prolactin with egg production / J. X. Cui [et al.] // *Poultry Science*. – 2006. – Vol. 85, № 1. – P. 26–31.
16. Trait association of genetic markers in the growth hormone and the growth hormone receptor gene in a White Leghorn strain / X. P. Feng [et al.] // *Poultry Science*. – 1997. – Vol. 76, № 12. – P. 1770–1775.
17. Insulin-like growth factor I gene polymorphism associations with growth, body composition, skeleton integrity, and metabolic traits in chickens / H. Zhou [et al.] // *Poultry Science*. – 2005. – Vol. 84, № 2. – P. 212–219.
18. Митрофанова, О. В. Полиморфизм в промоторе гена пролактина и его ассоциация с направлением продуктивности у кур / О. В. Митрофанова, Н. В. Дементьева, А. А. Крутикова // *Научный журнал КубГАУ*. – 2015, № 111(07). – С. 1–10.
19. Effect analysis of prolactin (*PRL*) gene polymorphisms on chicken egg productivity (*Gallus gallus domesticus*) BC1 from crossbreeding between Pelung and Layer chicken / R. Kilatsih [et al.] // *Iranian Journal of Applied Animal Science*. – 2020. – Vol. 10, № 4. – P. 717–726.
20. Polymorphism of Prolactin gene in relation to egg production performance in Kadaknath hens / S. K. Yadav [et al.] // *Indian Journal of Animal Research*. – 2018. – Vol. 52, № 2. – P. 208–211.
21. Polymorphism in prolactin and PEPCK-C genes and its association with economic traits in native fowl of Yazd province / H. E. Begli [et al.] // *Iranian Journal of Biotechnology*. – 2010. – Vol. 8, № 3. – P. 172–177.
22. Association of prolactin and prolactin receptor gene polymorphisms with economic traits in breeder hens of indigenous chickens of Mazandaran province / H. Rashidi [et al.] // *Iranian Journal of Biotechnology*. – 2012. – Vol. 10, № 2. – P. 129–135.
23. Кулибаба, Р. А. Полиморфизм генов гормона роста, рецептора гормона роста, пролактина и рецептора пролактина в связи с яичной продуктивностью у кур породы полтавская глинистая / Р. А. Кулибаба // *Сельскохозяйственная биология*. – 2015. – Т. 50, № 2. – С. 198–207.
24. Генетическая структура кур украинской селекции мясорыночного направления продуктивности / С. В. Рудая [et al.] // *Актуальные проблемы интенсивного развития животноводства*. – 2018, № 21-1. – С. 93–99.
25. Lumatauw, S. A 24-bp Indel (insertion-deletion) polymorphism in promoter prolactin gene of Papua local chickens / S. Lumatauw, M. A. Mu'in // *Animal Production*. – 2016. – Vol. 18, № 1. – P. 1–7.
26. Single nucleotide polymorphisms of candidate genes related to egg production traits in Vietnamese indigenous chickens / N. T. Vinh [et al.] // *Brazilian Journal of Poultry Scienc*. – 2021. – Vol. 23, № 2. – P. 1–6.
27. Al-Sheikh, A. A. Effect of prolactin gene polymorphisms on egg weight of White Leghorn and Hy-line Brown laying hen strains / A. A. Al-Sheikh, I. H. Ismail // *Iraqi Journal of Biotechnology*. – 2017. – Vol. 16, № 2. – P. 1–9.
28. Vu, C. T. Single nucleotide polymorphisms in candidate genes associated with egg production traits in native Noi chicken of Vietnam / C. T. Vu, N. T. Ngu // *International Journal of Plant, Animal and Environmental Sciences*. – 2016. – Vol. 6, № 1. – P. 162–169.
29. Abdi, M. Prolactin and NPY gene polymorphism and its associations with production and reproductive traits in West-Azerbaijan native chicken / M. Abdi, H. Seyedabadi, A. Gorbani // *Bulletin of Environment, Pharmacology and Life Sciences*. – 2014. – Vol. 3, № 6. – P. 39–45.
30. Polymorphism of prolactin (*PRL*) gene in native chicken, 'ZO-AR' of Mizoram, India / P. Bora [et al.] // *International Journal of Livestock Research*. – 2021. – Vol. 11, № 3. – P. 114–118.
31. Nei, M. Sampling variances of heterozygosity and genetic distance / M. Nei, A.K. Roychoudhury // *Genetics*. – 1974. – Vol. 76, № 2. – P. 379–390.
32. Association of polymorphisms for prolactin and prolactin receptor genes with broody traits in chickens / R.-S. Jiang [et al.] // *Poultry Science*. – 2005. – Vol. 84. – P. 839–845.
33. Polymorphisms of prolactin gene in a native chicken population and its association with

- egg production / A. S. Bagheri Sarvestani [et al.] // Iranian Journal of Veterinary Research. – 2013. – Vol. 14, № 2. – P. 113–119.
34. PCR-RFLP study of candidate genes for egg production in layer chicken / B. G. Roy [et al.] // Archives of Animal & Poultry Sciences. – 2020. – Vol. 1, № 3. – P. 52–58.
35. Kulibaba, R. A. Transforming growth factor b1, pituitary-specific transcriptional factor 1 and insulin-like growth factor I gene polymorphisms in the population of the Poltava clay chicken breed: association with productive traits / R. A. Kulibaba, A. V. Tereshchenko // Agricultural Science and Practice. – 2015. – Vol. 2, № 1. – P. 67–72.
36. Genetic analysis of SNPs in *GH*, *GHR*, *IGF-I* and *IGFBP2* genes and their association with some productive and reproductive traits in native breeder hens / H. Kazemi [et al.] // Gene Technology. – 2018. – Vol. 7, № 1. – P. 1–7.
37. Growth hormone gene polymorphism in chicken divergently selected for axial skeleton malformation / B. Wardęcka [et al.] // Journal of Animal and Feed Sciences. – 2005. – Vol. 14. – P. 561–570.
38. Polymorphisms of growth hormone gene in a native chicken population: association with egg production / S. G. Makhsous [et al.] // Bull Vet Inst Pulawy. – 2013. – Vol. 57. – P. 73–77.
39. Kulibaba, R. A. *MspI* polymorphism in fourth intron of the growth hormone gene in chicken populations of different breeds: analysis of the causes of additional restriction pattern origin / R. A. Kulibaba, P. S. Yurko, Y. V. Liashenko // Cytology and Genetics. – 2015. – Vol. 49, № 6. – P. 372–377.
40. Growth hormone gene polymorphism and its correlation with different traits in Bantam and White Leghorn chicken / S. Shahnaz [et al.] // Indian Journal of Poultry Science. – 2008. – Vol. 43, № 2. – P. 123–127.
41. Genotypic frequency in Asian native chicken populations and gene expression using insulin-like growth factor I (*IGFI*) gene promoter polymorphism / H. Moe [et al.] // The Journal of Poultry Science. – 2009. – Vol. 46, № 1. – P. 1–5.
42. Anh, N. T. L. Association of chicken growth hormones and insulin-like growth factor gene polymorphisms with growth performance and carcass traits in Thai broilers / N. T. L. Anh, S. Kunhareang, M. Duangjinda // Asian-Australasian Journal of Animal Sciences. – 2015. – Vol. 28, № 12. – P. 1686–1695.
43. Associations between *IGFI*, *IGFBP2* and *TGFβ3* genes polymorphisms and growth performance of broiler chicken lines / B. Hosnedlova [et al.] // Animals. – 2020. – Vol. 10. – P. 1–24.
44. Allelic polymorphism of insulin like growth factor 1 gene and its effect on growth performance of FUNAAB Alpha chickens / H. T. Ojoawo [et al.] // International Journal of Innovative Science and Research Technology. – 2020. – Vol. 5, № 4. – P. 817–823.
45. Insulin-like growth factor-I gene polymorphism and its association with growth and slaughter characteristics in broiler chickens / J. Kadlec [et al.] // Journal of Agrobiological. – 2011. – Vol. 28, № 2. – P. 157–163.
46. Allelic polymorphism of *GH*, *GHR* and *IGF-I* genes and their association with growth and carcass traits in Mazandaran native fowl / H. Attarchi [et al.] // Poultry Science Journal. – 2017. – Vol. 5, № 1. – P. 25–30.
47. *IGF-I* gene polymorphism and its associations with some growth traits in West-Azerbaijan native chicken using PCR-RFLP techniques / M. S. Babayi [et al.] // Bulletin of Environment, Pharmacology and Life Sciences. – 2014. – Vol. 3, № 6. – P. 29–32.
48. Evanno, G. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study / G. Evanno, S. Regnaut, J. Goudet // Mol. Ecol. – 2005. – Vol. 14, № 8. – P. 2611–2620.

A. N. Zainchkovskaya¹, E. P. Khmylevskaya¹, A. M. Shishlova-Sokolovskaya¹, S. V. Kosyanenko²,
A. A. Famina¹, O. Yu. Urbanovich¹

GENETIC DIVERSITY OF THE CHICKEN LINES OF BELARUSIAN BREEDING BY ALLELIC COMPOSITION OF *PRL*, *GH* AND *IGF-I* GENES ASSOCIATED WITH PRODUCTIVITY

¹State Scientific Institution

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

27 Akademicheskaya St., 220072 Minsk, Belarus

e-mail: annazainchkovskaya@mail.ru

²RSUE "Experimental Scientific Station for Poultry Breeding"

2a Yubileinaya St., 223036 Zaslavl, Belarus

The genetic structure of the populations of the Rhode-Island Red chicken line K₁ and the White Leghorn chicken line B(5) of the Belarusian selection was determined according to the 24 InDel and C-2402T polymorphisms of the prolactin gene *PRL*, *MspI* polymorphism in 1 and 4 introns of the growth hormone gene *GH*, as well as *HinfI* polymorphism of the insulin-like growth factor I gene *IGF-I*. It was shown that males and females of the White Leghorn chicken line B(5) of egg productivity and the Rhode-Island Red chicken line K₁ of egg-meat productivity differ in the allele occurrence frequency of the studied genes. The alleles of the *PRL* and *GH* genes associated with increased egg productivity were the most widespread among the representatives of the White Leghorn chicken line B(5). The data obtained can be used for the targeted selection of the hens of the studied lines.

Keywords: chicken, polymorphism, molecular markers, candidate genes, *PRL*, *GH*, *IGF-I*.

Дата поступления в редакцию: 06 сентября 2021 г.

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

НАПРАВЛЕНИЯ СОВРЕМЕННОЙ ПАЛИНОЛОГИИ И ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ БАРКОДИРОВАНИЯ ДНК ДЛЯ ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ РАСТЕНИЙ ПО ПЫЛЬЦЕ

¹Государственное научное учреждение
«Институт генетики и цитологии Национальной академии наук 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»
Республика Беларусь, 220114, г. Минск, ул. Филимонова, 25

Классическая палинология основывается на морфологическом описании пыльцы, полученной методом световой микроскопии, которая наряду с преимуществами имеет и ряд ограничений. Благодаря генетическому исследованию палиномов (смесей пыльцы и спор разных видов растений) будет возможно получить более точную дифференциацию видового состава пыльцы и анализом ДНК заменить или эффективно дополнить морфологический анализ. Приведенный обзор литературы показывает большой потенциал использования баркодирования ДНК пыльцы в ряде областей прикладной палинологии.

Ключевые слова: палинология, баркодирование, пыльца, ДНК пыльцы, высокопроизводительное секвенирование.

Введение

Палинология (от греч. *paline* — пыль) — комплексная биологическая дисциплина, объектом исследования которой являются споры и пыльца растений, грибов и бактерий. Спорно-пыльцевой анализ появился еще в первой половине XX века и был основан на описании морфологических особенностей пыльцы, видимой в световой микроскоп. Пыльцевые зерна часто имеют специфическую морфологию с разнообразной структурой внешней оболочки. Благодаря тому, что форма, размеры, текстура и рисунок внешней оболочки зерен пыльцы и спор во многих случаях имеют отличия у разных групп растений, это дает возможность определить таксономическую принадлежность пыльцы.

Дифференциация видового происхождения пыльцы находит множество применений, включая реконструкцию древних растительных сообществ, мониторинг аллергенов, оценку сетей опылителей, установление подлинности и качества продукции, проведение судебных экспертиз. Возрастающие потребности в получении достоверных данных с по-

мощью анализа пыльцевого материала, с одной стороны, и расширение возможностей применения полученной палинологической информации, с другой стороны, приводит к совершенствованию методов палинологии, в том числе и за счет внедрения подходов молекулярной биологии.

Растения, особенно ветроопыляемые, вырабатывают пыльцу в огромных количествах. Из-за своих микроскопических размеров пыльца находится во взвешенном состоянии в воздухе и встречается повсеместно: оседает на поверхности земли и всего, что на ней находится, на поверхности и в толще вод, в грунтовых водах, глубоко в скалах, в помещениях, содержится в воздухе, вдыхаемом людьми и животными. Благодаря этому пыльца представляет собой широко распространенный биомаркер, используемый в основном для определения географического и временного происхождения объектов, сохранивших пыльцу растений на своей поверхности.

Современная палинология — во многом наука прикладная, и ее интенсивное развитие, наблюдаемое в последнее время, связано

с появлением все более новых направлений применения споро-пыльцевого анализа [1, 2]. Так, пыльца растений может быть важным криминалистическим маркером при расследовании уголовных и административных дел. Однако его использование в настоящее время ограничено необходимостью наличия узких специалистов в области морфологии пыльцы; большими трудовыми затратами, связанными с подготовкой препаратов и подсчетом пыльцевых зерен под световым микроскопом; относительно низким таксономическим разрешением, так как выявить морфологические различия пыльцы на видовом уровне не всегда возможно.

Метод определения пыльцы с использованием баркодирования ДНК (ДНК-штрихкодирование, генетический баркодинг, ДНК-баркодинг, англ. DNA barcoding) способен расширить возможности палинологии. Новые технологии секвенирования, стандартизированные генетические маркеры растений и принципы метабаркодирования дают возможность анализировать сложные пробы, такие как многокомпонентные смеси пыльцы различных видов растений.

Методы изучения пыльцы

В палинологии выделяют центральный, исторически первый раздел — палиноморфологию, которая занимается изучением морфологического строения пыльцевых зерен и спор, описанием их ультраструктуры и развития, классификацией морфологических признаков по палиноморфологическим типам, разработкой ключей для определения и сравнения близкородственных групп. Особенности строения спородермы являются информативным морфологическим признаком для определения надвидовых таксонов. Но не все растительные таксоны полно и всесторонне исследованы с палиноморфологической точки зрения, и палиноморфология в настоящее время представляет собой развивающуюся область ботанических исследований [3–6]. Полученные данные используются для уточнения вопросов систематики и филогении растений, для решения частных проблем селекции сельскохозяйственных культур, имеют широкое применение и в ряде других прикладных дисциплин.

Несмотря на разнообразное научное и прак-

тическое использование, метод микроскопии пыльцы имеет ряд существенных ограничений. Из-за отсутствия полной палиноморфологической информации многие типы пыльцы просто сгруппированы на уровне рода или семейства, а анализ данных о разнообразии пыльцы сильно ограничен. У некоторых групп растений нет морфологических различий пыльцы на видовом уровне, из-за чего метод имеет невысокое таксономическое разрешение и не позволяет провести границу между отдельными близкородственными видами [7–10]. Дифференциация пыльцы методами микроскопии является медленной, трудоемкой процедурой и требует высококвалифицированных специалистов-практиков. На протяжении десятилетий определение и количественная оценка пыльцевых зерен зависели от немногочисленных узкоспециализированных экспертов, к подготовке и опыту которых предъявлялись высокие требования. Кроме того, необходимо наличие эталонных коллекций постоянных препаратов, атласов микрофотографий пыльцевых зерен, системы морфологического описания и классификации пыльцы. Некоторые упрощения морфологического метода были достигнуты благодаря частичной автоматизации анализа пыльцы, которая позволяет достичь более высокой скорости обработки образцов, повысить объективность, облегчить дифференциацию на основе смешанных выборок, что делает ее привлекательной для крупномасштабных исследований [11]. Были усовершенствованы методы автоматического анализа микропрепаратов, создано программное обеспечение обработки изображений для подсчетов и классификации пыльцы [12].

Альтернативой и/или дополнением морфологических методов в исследовании пыльцы стали молекулярные методы, использование которых существенно расширило возможности пыльцевого анализа. Благодаря разнообразию, постоянному усовершенствованию и открытию новых молекулярных подходов, стало возможным изучение пыльцы редких и слабо изученных растительных таксонов.

С начала 90-х в выделенной из пыльцы ДНК исследовали отдельные гены, ответственные за развитие поллинозов, за тканеспецифические процессы, протекающие в пыльце, применяя при этом доступные в то время методы:

выделение РНК и создание библиотек кДНК с последующим анализом конкретных генов, методом секвенирования по Сэнгеру и Нозерн- и Саузерн-блоттинга [13, 14]. Тогда же были предприняты первые попытки определения растений по маркерным участкам внутреннего транскрибируемого спайсера и рибулозо-бисфосфат карбоксилазы (ITS — internal transcribed spacer и rbcL — ribulose-bisphosphate carboxylase), используя в качестве источника ДНК пыльцу [15]. Позже появилась методика извлечения ДНК из одиночных пыльцевых зерен с последующей амплификацией коротких (до 200 п. н., в отдельных случаях 300–400 п. н.) фрагментов исследуемых генов [16, 17]. На образцах ДНК пыльцы проводили AFLP-анализ (Amplified Fragment Length Polymorphism) для мультилокусного маркирования генотипов и STR-анализ (Short Tandem Repeat) для идентификации генотипов [16, 18, 19]. Для определения набора растительной пыльцы в образцах меда была адаптирована методика ПЦР в реальном времени, чтобы различить мед из различных географических регионов [20].

С распространением ДНК-баркодинга для определения видовой принадлежности растений этот метод стал применяться и на пыльце. ДНК-баркодинг (ДНК-штрихкодирование) — идентификация и классификация организмов по стандартной короткой нуклеотидной последовательности, часто и успешно применяется ко всем основным группам организмов, в том числе и к растениям. Материалом может служить любой фрагмент организма, из которого можно выделить качественный препарат ДНК, подходящий для последующего секвенирования. Несмотря на то, что большинство ДНК-баркодов, используемых для идентификации растений, находятся в пластидном геноме, было показано, что гены пластидной ДНК могут амплифицироваться и в пыльце [21–24].

Чаще всего палинологические образцы пыльцы представляют собой смесь пыльцы и спор разных видов растений — т. н. палиномы, поэтому для секвенирования ДНК по методу Сэнгера образцы необходимо разделить на отдельные компоненты. Это утомительная, подверженная ошибкам задача, требующая ручного разделения пыльцы по групповым признакам, каждая из которых должна ам-

плифицироваться и секвенироваться индивидуально. Существует метод, при котором под микроскопом из смеси извлекают отдельные пыльцевые зерна и проводят их секвенирование. Такую сортировку, как и при морфологическом анализе пыльцы, можно использовать для единичных исследований, но она неудобна для массового применения [16, 18]. Другой способ разделения смеси заключается в выделении ДНК из смеси, совместной амплификации и последующем клонировании ампликонов, метод также трудоемкий и не подходит для массового анализа [21].

Удобным инструментом генетического анализа, позволяющего работать со смешанными образцами и эффективно определять виды в многокомпонентных смесях, является высокопроизводительное секвенирование или секвенирование нового поколения (MPS — massively parallel sequencing; NGS — next generation sequencing). Определение таксономического состава сложных образцов путем высокопроизводительного секвенирования последовательностей общих маркерных генов-баркодов (или штрихкодов) получило название метабаркодинг. Изучение видового состава пыльцы с помощью метабаркодинга сначала было применено для контроля качества меда, полученного от разных растений. Показано, что метод относительно прост в реализации, не требует специальных навыков для анализа, более надежен, чем классические методы и его легко применять для крупномасштабного исследования [25]. Результаты метабаркодинга пыльцы сравнивали с данными, полученными с помощью световой микроскопии тех же образцов; была получена большая разрешающая способность метода высокопроизводительного секвенирования, так как с его помощью было идентифицировано большее количество таксонов и не требовалось специальных знаний экспертов-палинологов [26]. С тех пор многочисленные исследования используют потенциал метабаркодинга для решения задач крупномасштабной идентификации пыльцевых смесей в целом ряде областей, отработывая рекомендации по стандартизации и совершенствованию метода и решая возникающие технические проблемы [23, 27, 28].

Области прикладной палинологии

Палеопалинология

Пыльца растений, покрывая в большом количестве поверхность земли, со временем перекрывается слоем грунта и переходит в ископаемое состояние. Пыльца и споры растений имеют прочную внешнюю оболочку, состоящую из спорополленина, одного из самых стойких органических веществ, способного выдерживать длительные температурные и химические воздействия. Благодаря этому пыльца может сохраняться в геологических отложениях на протяжении сотен миллионов лет.

На способности пыльцы существовать в практически неизменном виде в течение длительных периодов основано первое из прикладных направлений палинологии — палеопалинология, которая изучает закономерности рассеивания и захоронения (фоссилизации) пыльцевых зерен и спор. Анализ пыльцы впервые был применен Леннартом фон Постом в 1916 г. в исследованиях озерных и болотных отложений для реконструкции растительного покрова прежних геологических эпох. К середине XX века метод пыльцевого анализа стал все более используемым в палеонтологических исследованиях, появились первые руководства по палеопалинологии [29].

Результаты анализа помогают реконструировать растительный покров и климат прошлых эпох, устанавливая стратиграфические границы в геологических разрезах. Анализ пыльцы осадочных пород и торфов позволяет решать задачи других естественнонаучных дисциплин — палеоботаники, палинотаксономии, систематики растений, палеогеографии, геоморфологии, геологии, стратиграфии [2, 30].

ДНК, извлеченная из ископаемых образцов, относится к так называемой аДНК (ancient DNA, древняя ДНК). Из-за гидролитического и окислительного повреждения выделение ДНК из образцов старше 100 тыс. лет крайне неэффективно. Это особенно верно в отношении растений, у которых хорошо сохраняется только окаменелая твердая древесина, не пригодная для выделения ДНК [31]. Разработка метода извлечения аДНК из ископаемой пыльцы помогает избежать таких ограничений, как проблемы с загрязнением, методологические трудности, редкая встречаемость подходящих окаменелых образцов и способствует более

широкому использованию генетического анализа для популяционных и эволюционных исследований. Генетическая информация, извлеченная из пыльцы, является наиболее полной и доступной, по сравнению со всеми другими группами окаменелостей, поэтому во временных рамках в десятки тысяч лет она играет ведущую роль в решении вопросов скорости геномных изменений и понимания темпов эволюции. Сравнение древних последовательностей ДНК с современными, дает возможность установить прямую генетическую связь и генетическую преемственность между современными и ископаемыми образцами [32].

Как дополнение к традиционному морфологическому мониторингу биоразнообразия древних почвенных отложений используют метабаркодинг. В этом случае универсальными маркерами стали более короткие фрагменты пластидного генома, так как обычные баркоды растений не всегда можно амплифицировать с деградированных молекул аДНК. Одной из таких коротких маркерных последовательностей является область петли Р6 интрона *trnL* пластидной ДНК, которая эффективна при оценке биоразнообразия в древних смешанных отложениях. В случае палеопалинологии, баркодинг предлагается именно как дополнение микроскопического анализа ископаемой пыльцы, так как данные, полученные обоими методами, дали в основном неперекрывающиеся списки таксонов, каждый из двух методов способен обнаружить свой состав флоры, и ни один не является полностью исчерпывающим [33]. Так, микроскопический анализ пыльцы растений голоцена позволил обнаружить большее число таксонов, чем анализ ДНК, но растения, вырабатывающие ограниченное количество пыльцы, легче идентифицировались методом секвенирования. Кроме того, анализ ДНК позволяет идентифицировать образцы на более низком таксономическом уровне. Сравнение двух методов секвенирования — клонирование и секвенирование по Сэнгеру с метабаркодированием, выявило, что оба метода дают схожие результаты [33].

Метод анализа пыльцы успешно применяется при решении задач археологической палинологии — исследовании археологических памятников, изучении окружающей среды человека в древности и средневековье, оцен-

ке влияния изменений климата на различные аспекты жизни человека в прошлом [34]. Палинологические исследования археологических памятников позволяют реконструировать растительность на конкретной территории, воссоздавать климат, определять тип хозяйства древнего населения, оценить влияние антропогенного фактора на окружающую среду. Палинологический анализ применяется для уточнения хронологии на археологических памятниках, в случае, когда стратиграфический метод — определение хронологии по материальным находкам, залегающим в культурных слоях, оказывался недостаточно эффективным [34, 35].

Аэропалинология

Пыльца и споры растений, находящиеся во взвешенном состоянии в воздухе, составляют существенную часть так называемых биоаэрозолей — микроскопических частиц биологического происхождения в атмосфере. Биоаэрозоли, которые помимо пыльцы и спор содержат микроскопические фрагменты растений, животных, лишайников, водорослей, грибов, а также вирусы, бактерии, простейшие, распространяются на большие расстояния между континентами и на большие высоты, достигая пределов тропосферы [36, 37]. Пыльцу и споры, пассивно циркулирующих в атмосферных потоках, изучает аэропалинология, одна из задач которой состоит в оценке качественного и количественного составов аэроспектра, в выявлении суточной и сезонной динамики пыления растений. Аэропалинологические исследования необходимы при ландшафтном обустройстве городов и рекреационных мест, при проведении экологических, географических и климатических исследований [38, 39].

В период цветения в атмосферу попадает большое количество пыльцы, которая подхватывается вихревыми вертикальными потоками и попадает в более высокие слои, намного выше растительного покрова [40, 41]. Горизонтально биологические аэрозоли могут разноситься на большие расстояния, оказываясь над океанами и над другими континентами за тысячи миль от предполагаемых источников [42]. В верхних слоях атмосферы наиболее мелкая пыльца и споры могут быть центрами конденсации облаков — частицами, на которых конденсируется водяной пар, становясь

тем самым регулирующим фактором в образовании осадков и влияя на гидрологический цикл и климат [43]. В морской среде твердые частицы биологического происхождения являются наиболее активными центрами образования кристаллов льда, так называемой биологической нуклеации льда [44].

Биологические аэрозоли атмосферы в настоящее время активно изучаются. Несмотря на непосредственное участие в атмосферно значимых процессах, пока нет достаточной информации об их составе, численности, источниках происхождения [45]. Биологическую составляющую аэрозолей, так называемый атмосферный микробиом, анализируют с использованием методов MPS, что позволяет всесторонне определить разнообразие организмов в пробе аэрозоля [36, 46, 47]. Являясь репродуктивными единицами, пыльца и споры в составе биоаэрозолей играют важную роль в распространении растений и грибов, так как конвекционное перемещение слоев атмосферы позволяет преодолевать большие расстояния и любые географические барьеры. Таким способом происходит генетический обмен между разными ареалами обитания, заселение новых для вида территорий и осуществление географических сдвигов биомов. Биоаэрозоли рассматриваются как важный элемент в развитии, эволюции и динамике экосистем, воздействующий на фундаментальные процессы экологии и эволюции растений [48]. Изучение особенностей рассеивания спор патогенных грибов в зависимости от географического положения источника и направления распространения позволяет предотвратить экономические потери в сельском хозяйстве [46].

Экологическая палинология

Экологическая палинология — самостоятельная часть экологического мониторинга состояния окружающей среды, опирающаяся на анализ видового состава пыльцы, полученной из современных или ископаемых источников. Она занимается изучением экологии отдельных регионов, сменой биоценозов, прогнозом изменений состояния окружающей среды. Видовой состав пыльцы в поверхностном слое почвы отражает существующее в данной местности разнообразие растительности. Использование молекулярных методов в палинологическом анализе поверхностного слоя

почвы позволяет оценить биоразнообразие и установить особенности локального изменения растительности [49].

Существенным аспектом экологической палинологии является проблема взаимодействия растений и их опылителей. Движение пыльцы имеет важное значение для долгосрочной структуры и функций растительных сообществ как естественных, так и управляемых систем сельского хозяйства [50]. Вопросам сохранения и использования опылителей уделяется внимание, например, в Конвенции о биологическом разнообразии, как ключевом документе в процессе принятия более устойчивых решений для перехода к созданию эффективных продовольственных систем [51]. Знание флоры в регионе, динамики переноса пыльцы, конкуренции между опылителями необходимо для успешного пчеловодства, как в вопросах содержания пчел, так и для производства продуктов пчеловодства [52].

Использование метабаркодинга для анализа ДНК смешанных проб пыльцы, собранных с опылителей или с растений, позволяет получить более четкое представление о биологии опыления, повысить таксономическое разрешение структуры сетей растение–опылитель, изучать конкуренцию между растениями и/или опылителями, а также биогеографию растений. Полученные результаты помогают отслеживать изменения в растительных сообществах, анализировать динамику взаимодействия между растениями и опылителями с течением времени, что в итоге дает информацию об антропогенных изменениях ландшафта, таких как фрагментация среды обитания или изменение климата [53, 54, 55]. Экологическая палинология может использовать материал исторических коллекций насекомых-опылителей, многие из которых при сборе содержали пыльцу. Эти данные важны для сохранения эталонных состояний сообществ в проектах, направленных на экологическое восстановление [1].

Выращивание генетически модифицированных (ГМ) сельскохозяйственных культур вызывает многочисленные опасения во многих странах мира. Ауткроссинг генетически модифицированных организмов (ГМО) с самого начала был критической проблемой, поскольку пыльца, переносимая по воздуху, считалась

важным способом распространения ГМО. Использование генетического анализа проб пыльцы из воздуха в сочетании с микроскопическим анализом позволило проводить экологический мониторинг выращивания ГМО на определенной территории. Продемонстрирована применимость этого подхода в различных климатических условиях, в сельских и пригородных районах, даже при очень низком уровне переносимой по воздуху пыльцы, что может помочь в наблюдениях за зонами, свободными от ГМО (например, такими, как центры происхождения, природные заповедники) [56].

Анализ видового состава гранул пыльцы, переносимой медоносными пчелами и собранной из ульев, позволил выявить, что на состав пыльцы в значительной степени влияет местное флористическое биоразнообразие, фенология растений и присутствие чужеродных цветущих видов. Благодаря собранной эталонной базе данных ДНК-баркодов *rbcL* и *trnH-psbA* стало возможным идентифицировать пыльцу на уровне видов растений, что оказалось полезным при получении продуктов пчеловодства с конкретными пищевыми или терапевтическими характеристиками, востребованных на рынке [21].

Мелиссопалинология

Мелиссопалинология изучает пыльцевой состав меда и других продуктов пчеловодства. В настоящее время существует проблема разработки критериев палинологической аутентичности меда в зависимости от региона происхождения и видового состава пыльцы. Видовая принадлежность пыльцы, содержащейся в меде, позволяет установить его натуральность и эколого-геоботаническую привязку по спектру представленных семейств растений, и является одной из важнейших характеристик качества меда наряду с органолептическими и биохимическими показателями. Идентификация образцов цветочной пыльцы, присутствующих в меде, важна для определения его лекарственной ценности, а также для выборочного выращивания местных растений, важных для медоносных пчел [57].

Характеристика и стоимость меда зависят от растений, с которых он был собран, поэтому при маркировке меда требуется обязательное указание источника пыльцы. Существуют монофлоральные сорта меда (если содержание

пыльцы одного вида превышает 45%) и мультифлоральные, стоимость которых значительно ниже, что может приводить к заведомой фальсификации. Видовой состав нектара необходимо выяснять и с точки зрения безопасности, так как отмечены случаи, когда мед содержал пыльцу ядовитых растений и представлял опасность для здоровья человека [58].

Поскольку мед содержит пыльцу нескольких десятков видов растений, для его анализа преимущественно используются методы, позволяющие работать со смешанными образцами пыльцы. Традиционное микроскопическое исследование позволяет выявить количественный состав видов в пыльце, особенно тех, которые присутствуют в небольших количествах. Однако, как и во всех областях прикладной палинологии, микроскопические наблюдения трудоемки, требуют много времени и специальных палинологических знаний. В то же время преимущество метабаркодирования ДНК состоит в том, что оно позволяет провести скрининг крупных выборок и обеспечивает большее разрешение для некоторых семейств растений [22].

Видовой состав флоры конкретного региона имеет определяющее значение для того, какие ДНК-баркоды окажутся наиболее эффективными для анализа меда. Баркодирование по отдельным локусам выявило, что для флоры одного региона разрешающая способность пластидных баркодов (*matK*, *rbcL*) выше, чем рибосомного ДНК-штрихкода (*ITS*) [24]. Тогда как для определения видовой состава флоры другого региона максимальное количество видов идентифицировано с помощью *ITS2* и *matK* [59]. Таким образом, мультилокусное баркодирование смешанного образца пыльцы может быть более надежным, чем отдельный анализ индивидуальных локусов. В связи с этим, актуален поиск новых вариантов баркодов и их комбинаций, оптимизированных для молекулярной мелиссопалинологии. Отсутствие баз данных по пыльце растений изучаемого региона или отсутствие достаточной информации для таксономической классификации пыльцы является фактором, снижающим эффективность методов анализа образцов меда [59].

Медицинская палинология

Пыльца растений — один из основных ал-

лергенов, вызывающий у людей поллинозы. Тяжесть симптомов поллинозов зависит от таксономического происхождения пыльцы, вызвавшей аллергию и концентрации аллергена. Мониторинг пыльцы аллергенных растений, особенно в составе городских насаждений, позволяет получить информацию, полезную для врачей-аллергологов и их пациентов. В последние десятилетия были разработаны различные программы мониторинга пыльцы, созданы базы данных наблюдения за пыльцой, доступ к которым позволяет медицинским службам лучше контролировать аллергенную обстановку и проводить медицинские мероприятия по профилактике сезонных заболеваний [1]. Распространенность и тяжесть аллергических заболеваний также зависит от факторов, связанных с изменением климата. Изменения климата влияют на физиологию и распространение растений и грибов: повышение температуры, грозы, концентрации CO₂ влияют на производство пыльцы и спороношение грибов, содержание аллергенов в спорах и пыльце, на закономерности распределения аэроаллергенов [46]. Усложняется ситуация в городах, когда пыльца смешивается с выхлопными газами и иными загрязняющими веществами, характерными для города.

Нет единого мнения о том, сколько видов растений продуцируют пыльцу с аллергенной активностью, их количество у разных авторов варьирует от 50 до 2 000 [60]. Существует мнение, что в той или иной степени аллергенными являются все покрытосемянные растения [60]. Таким образом, данная ситуация требует повышенного внимания со стороны медицинских служб, что, в свою очередь, создает потребность в инструменте, который будет способен быстро и максимально полно идентифицировать пыльцу различных видов растений.

Как и в других областях прикладной палинологии, для анализа видовой состава пыльцы, содержащейся в воздухе и вызывающей аллергию, в последнее время стали использовать метабаркодирование ДНК на основе секвенирования нового поколения MPS по технологии полупроводникового секвенирования (Ion Torrent) с анализом участка *trnL* дало возможность провести более точное таксономическое разделение видов растений по выделенной из

пыльцы ДНК, чем проводившийся параллельно с использованием метода световой микроскопии [23].

Судебная палинология

Судебная палинология — это раздел палинологии, где изучение пыльцы используется для доказательства или опровержения связи между объектами, людьми и определенными местами [61, 62].

Растения произрастают в определенных физико-географических условиях, формируя ареал вида. Однако хозяйственная деятельность человека приводит к существенным изменениям природных ландшафтов, интродуцируя несвойственные растения в природные фитоценозы, где наряду с коренными видами встречаются нехарактерные для данной местности растения, особенно это характерно для городских ландшафтов. Пыльца и споры, в значительных количествах производимые растениями, оседают и накапливаются на поверхностях различных предметов, формируя сложный и уникальный спорово-пыльцевой комплекс. Благодаря этой особенности становится возможным отвечать не только на вопросы, касающиеся определения географического и временного происхождения объектов, но и решать идентификационные и диагностические задачи. Благодаря высокой летучести пыльцы круг исследуемых объектов-носителей крайне разнообразен. Это анонимные документы, лекарственные препараты, наркотические вещества, продукты питания, одежда и многое другое.

Судебная палинология полезна в случаях, когда имеет место перемещение вещественных доказательств, например, для сокрытия следов преступления при перезахоронении; помогает установить происхождение самодельных взрывных устройств, компьютеров и других трудно отслеживаемых объектов [63]. В настоящее время судебная палинология проводится на индивидуальной основе в исключительных случаях, когда следствию не хватает информации от более распространенных видов экспертов. Однако значение судебно-палинологической экспертизы растет, а ее применение в разных странах наглядно иллюстрирует, насколько данные о палиноморфах стали важным фактором раскрытия многих дел [64, 65].

В экспертной среде и научных статьях об-

суждается потенциал палинологии, но признается, что он в настоящее время лимитирован типичными для всех направлений палинологии ограничениями [1, 66]. Генетические методы изучения ДНК в криминалистике в основном применяются для идентификации человека, как правило, с помощью STR (Short Tandem Repeat) и в последнее время SNP (Single Nucleotide Polymorphism) анализа. С недавнего времени распространяются генетические методы в криминалистике для идентификации диких и домашних животных, а также отдельных особо важных видов растений, в основном с помощью STR и секвенирования. Применяемые методы требуют разработки молекулярных инструментов для каждого вида отдельно, который не применим к другим видам или объектам исследования, произошедшим от нескольких особей, т.е. к смесям. Чаще всего учреждения, которые проводят исследования, вынуждены формировать свою собственную, как правило, закрытую базу генотипов образцов, опираясь на самостоятельно полученные показатели частот. Это приводит к невозможности сформировать единую базу данных в краткосрочной перспективе и потенциальным ошибкам из-за отсутствия межлабораторных сличений.

ДНК баркодирование помогает преодолеть сложности путем секвенирования видоспецифичных генетических областей, универсальных для больших групп живых организмов. Основные преимущества метода ДНК-баркодирования в судебной палинологии следующие: он может использоваться для большого количества таксономических групп, не требует привлечения узких специалистов, позволяет установить таксономию образца при отсутствии выраженных таксономических признаков. В уголовных и административных делах важное значение имеет достоверность полученных выводов. Используя световую микроскопию в судебно-палинологической экспертизе, крайне важно, сколько спор было подсчитано исследователем. Высокопроизводительное секвенирование нового поколения дает возможность исследовать весь пул пыльцевых зерен в образце, в том числе в сложных смесях, тем самым максимально увеличивая достоверность полученных выводов [1].

Заключение

С начала своего появления и до настоящего времени палинологические исследования основывались на методах световой микроскопии. Благодаря успешному решению ряда научных и прикладных вопросов классическая палинология получила широкое распространение, области ее применения многочисленны и разнообразны. Однако необходимость в преодолении ограничений световой микроскопии стимулировала дальнейшее совершенствование методов анализа пыльцы, что привело в итоге к использованию молекулярно-генетических подходов в палинологии. Проводимые в последнее десятилетие исследования палиномов с помощью секвенирования пыльцевой ДНК, которые заменяют или дополняют традиционную микроскопию и дают большее таксономическое разрешение, применимы к широкому кругу исследовательских задач. Микроскопический анализ в некоторых отраслях заменяется анализом ДНК, в других используется по-прежнему, но эффективно дополняется генетическим анализом.

Приведенный аналитический обзор научной литературы показывает большой потенциал использования баркодирования ДНК пыльцы в экологической, социальной, экономической, судебной и других областях прикладной палинологии. Несмотря на достигнутые успехи, технологии секвенирования многокомпонентных образцов нуждаются в дальнейшей оптимизации. Для успешного проведения баркодирования ДНК пыльцы необходимы следующие составляющие: эффективный метод выделения ДНК из пыльцевого материала, универсальные генетические маркеры и референсная база данных последовательностей ДНК генетических маркеров. Кроме этого, в некоторых случаях, как любой генетический анализ, баркодирование ДНК требует деструктивного отбора проб. Это означает, что возможно, анализируемый объект для других методов исследования будет непригоден. Для решения этой проблемы следует, по возможности, генетический анализ пыльцы проводить в последнюю очередь после завершения всех остальных исследований. Однако, если позволяет объем проб, можно аликвотировать отобранный материал, параллельно проводя генетические и морфологические исследо-

вания. Таким образом, решение технических проблем и стандартизация протоколов исследований позволит эффективно использовать палинологическую информацию, полученную с помощью методов молекулярной биологии, в различных направлениях научной и практической деятельности человека.

Список использованных источников

1. Bell, K. L. Pollen DNA barcoding: current applications and future prospects / K. L. Bell [et al.] // *Genome*. – 2016. – Vol. 59, № 9. – P. 629–640.
2. Малолетко, А. М. К интерпретации спорово-пыльцевых спектров / А. М. Малолетко // *География и природопользование Сибири*. – 2013. – № 15. – С. 98–109.
3. Трошкина, В. И. Палиноморфологические особенности таксонов рода *Geranium* (Geraniaceae) Алтайской горной страны / В. И. Трошкина // *Turczaninowia*. – 2017. – Т. 20, № 3. – С. 36–54.
4. Цымбалюк, З. Н. Палиноморфология видов родов *Scrophularia*, *Verbascum* и *Celsia* (Scrophulariaceae) / З. Н. Цымбалюк, Е. Э. Северова // *Бюл. Моск. о-ва Испытателей природы. отд. биол.* – 2012. – Т. 117, № 3. – С. 33–42.
5. Золала, Х. А. Особенности ультраструктуры пыльцевых зерен семейства *Campanulaceae* / Х. А. Золала, С. В. Полева, Е. Э. Северова // *Бот. журн.* – 2011. – Т. 29, № 8. – С. 1076–1084.
6. Гаврилова, О. А. Разнообразие форм пыльцевых зерен и их распределение у некоторых видов и гибридов крыжовниковых / О. А. Гаврилова, О. А. Тихонова // *Труды Карельского научного центра РАН*. – № 3. – 2013. – С. 82–92.
7. Davies, C. P. Modern pollen precipitation from an elevational transect in central Jordan and its relationship to vegetation: Modern vegetation and pollen in Jordan / C. P. Davies, P. L. Fall // *J. Biogeogr.* – 2002. – Vol. 28, № 10. – P. 1195–1210.
8. Effects of plant community composition and flowering phenology on honeybee foraging in Mediterranean sylvo-pastoral systems / S. Bagella [et al.] // *Appl. Veg. Sci.* – 2013. – Vol. 16, № 4. – P. 689–697.
9. Mullins, J. Sampling pollens / J. Mullins, J. Emberlin // *J. Aerosol Sci.* – 1997. – Vol. 28, № 3. – P. 365–370.

10. Rahl, M. Microscopic Identification and Purity Determination of Pollen Grains / M. Rahl // Allergy Methods and Protocols: Methods in Molecular Medicine / coll. J. M. Walker; eds. M.G. Jones, P. Lympany. – Totowa, NJ: Humana Press, 2008. – Vol. 138. – P. 263–269.
11. Stillman, E. C. The needs and prospects for automation in palynology / E. C. Stillman, J. R. Flenley // Quat. Sci. Rev. – 1996. – Vol. 15, № 1. – P. 1–5.
12. Holt, K. A. Principles and methods for automated palynology / K. A. Holt, K. D. Bennett // New Phytol. – 2014. – Vol. 203, № 3. – P. 735–742.
13. Lafter, S. Complementary DNA cloning of the major allergen *Phl p* I from timothy grass (*Phleum pratense*); recombinant *Phl p* I inhibits IgE binding to group I allergens from eight different grass species / S. Lafter [et al.] // J Allergy Clin Immunol. – 1994. – Vol. 94, № 4. – P. 689–698.
14. Vaienta, R. Homology of the major birch-pollen allergen, *Bet v* I, with the major pollen allergens of alder, hazel, and hornbeam at the nucleic acid level as determined by cross-hybridization / R. Vaienta [et al.] // J Allergy Clin Immunol. – 1991. – Vol. 87, № 3. – P. 677–682.
15. Petersen, G. PCR and sequencing from a single pollen grain / G. Petersen, B. Johansen, O. Seberg // Plant Mol. Biol. – 1996. – Vol. 31, № 1. – P. 189–191.
16. Matsuki, Y. The determination of multiple microsatellite genotypes and DNA sequences from a single pollen grain: Technical article / Y. Matsuki, Y. Isagi, Y. Suyama // Mol. Ecol. Notes. – 2007. – Vol. 7, № 2. – P. 194–198.
17. Single-Pollen Genotyping // Single-Pollen Genotyping of Holocene Lake Sediments / L. Parducci, Y. Suyama; edit. Y. Isagi, Y. Suyama. – Springer, 2011. – Ch.8. – P. 102–106.
18. Aziz, A. N. Genetic mapping of *Echinacea purpurea* via individual pollen DNA fingerprinting / A. N. Aziz, R. J. Sauve // Mol. Breed. – 2008. – Vol. 21, № 2. – P. 227–232.
19. Schield, C. Identification and persistence of *Pinus* pollen DNA on cotton fabrics: A forensic application / C. Schield [et al.] // Sci. Justice. – 2016. – Vol. 56, № 1. – P. 29–34.;
20. Laube, I. Development of primer and probe sets for the detection of plant species in honey / I. Laube [et al.] // Food Chem. – 2010. – Vol. 118, № 4. – P. 979–986.
21. Galimberti, A. A DNA Barcoding Approach to Characterize Pollen Collected by Honeybees / A. Galimberti [et al.] // PLoS ONE. – 2014. – Vol. 9, № 10. – P. e109363.
22. Hawkins, J. Using DNA Metabarcoding to Identify the Floral Composition of Honey: A New Tool for Investigating Honey Bee Foraging Preferences / J. Hawkins [et al.] // PLOS ONE. – 2015. – Vol. 10, № 8. – P. e0134735.
23. Kraaijeveld, K. Efficient and sensitive identification and quantification of airborne pollen using next-generation DNA sequencing / K. Kraaijeveld [et al.] // Mol. Ecol. Resour. – 2015. – Vol. 15, № 1. – P. 8–16.
24. Richardson, R. T. Rank-based characterization of pollen assemblages collected by honey bees using a multi-locus metabarcoding approach / R. T. Richardson [et al.] // Appl. Plant Sci. – 2015. – Vol. 3, № 11. – P. e1500043.
25. Valentini, A. DNA Barcoding for Honey Biodiversity / A. Valentini, C. Miquel, P. Taberlet // Diversity. – 2010. – Vol. 2, № 4. – P. 610–617.
26. Keller, A. Evaluating multiplexed next-generation sequencing as a method in palynology for mixed pollen samples / A. Keller [et al.] // Plant Biol. – 2015. – Vol. 17, № 2. – P. 558–566.
27. Richardson, R. T. Application of ITS2 Metabarcoding to Determine the Provenance of Pollen Collected by Honey Bees in an Agroecosystem / R. T. Richardson [et al.] // Appl. Plant Sci. – 2015. – Vol. 3, № 1. – P. e1400066.
28. Sickel, W. Increased efficiency in identifying mixed pollen samples by meta-barcoding with a dual-indexing approach / W. Sickel [et al.] // BMC Ecol. – 2015. – Vol. 15, № 1. – P. 20.
29. Erdtman, G. An Introduction to the Study of Pollen Grains and Spores. / G. Erdtman / Handbook of Palynology. Morphology — Taxonomy — Ecology. – 1969. – T. 81, № 8–9. – P. 656–657.
30. Еловичева, Я. К. Палинология Беларуси : (к 100-летию Белорусского государственного университета) : в 4 ч. / Я. К. Еловичева // Интерпретация данных палинологического анализа в целях стратиграфии, палеогеографии и корреляции природных событий гляциоплейстоцена и голоцена / Я. К. Еловичева. – Минск, 2018. – С. 204–217.
31. Gugerli, F. Ancient plant DNA: review and prospects / F. Gugerli, L. Parducci, R. J. Petit // New Phytol. – 2005 – P. 10.
32. Bennett, K. D. DNA from pollen: principles

- and potential / K. D. Bennett, L. Parducci // *The Holocene*. – 2006. – Vol. 16, № 8. – P. 1031–1034.
33. Parducci, L. Molecular- and pollen-based vegetation analysis in lake sediments from central Scandinavia / L. Parducci [et al.] // *Mol. Ecol.* – 2013. – Vol. 22, № 13. – P. 3511–3524.
34. Насонова Э. Д. Палинология и археология: способы взаимодействия / Э. Д. Насонова // Материалы 52-й международной научной конференции, Новосибирск 11–18 апреля 2014 г. / Новосиб. гос. ун-т. – Новосибирск, 2014. – С. 63–64.
35. Насонова, Э. Д. Палинологический метод как способ стратификации археологических объектов на примере поселения Оськино болото / Э. Д. Насонова, Н. А. Рудая // *ДОСИАГИК*. – Т. 7, № 1. – С. 93–99
36. DeLeon-Rodriguez, N. Microbiome of the upper troposphere: Species composition and prevalence, effects of tropical storms, and atmospheric implications / N. DeLeon-Rodriguez [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 2013. – Vol. 110, № 7. – P. e 2575–2580.
37. Maki, T. Assessment of composition and origin of airborne bacteria in the free troposphere over Japan / T. Maki [et al.] // *Atmos. Environ.* – 2013. – Vol. 74 – P. 73–82.
38. Ненашева, Г. И. Аэропалинологический мониторинг аллергенных растений г. Барнаула : монография / Г. И. Ненашева; Ин-т водн. и экол. проблем СО РАН. – Новосибирск, 2013. – С. 29–31.
39. Despres, V. Primary biological aerosol particles in the atmosphere: a review / V. Despres [et al.] // *Tellus B Chem. Phys. Meteorol.* – 2012. – Vol. 64, № 1. – P. 15598.
40. Tackenberg, O. Modelling long-distance dispersal of plant diaspores by wind / O. Tackenberg // *Ecol. Monogr.* – 2003. – Vol. 73, №. 2. – P. 173–189
41. Soons, M. B. Determinants of long-distance seed dispersal by wind in grasslands / M.B. Soons [et al.] // *Ecology*. – 2004. – Vol. 85, № 11. – P. 3056–3068.
42. Hallar, A. G. Atmospheric bioaerosols transported via dust storms in the western United States: Bioaerosols in western u.s. dust storms / A. G. Hallar [et al.] // *Geophys. Res. Lett.* – 2011. – Vol. 38. – P. L17801.
43. Pope, F. D. Pollen grains are efficient cloud condensation nuclei / F. D. Pope // *Environ. Res. Lett.* – 2010. – Vol. 5, № 4. – P. 044015. – doi:10.1088/1748-9326/5/4/044015.
44. DeMott, P. J. New Directions: Need for defining the numbers and sources of biological aerosols acting as ice nuclei / P. J. DeMott, A. J. Prenni // *Atmos. Environ.* – 2010. – Vol. 44, № 15. – P. 1944–1945.
45. Fröhlich-Nowoisky, J. Bioaerosols in the Earth system: Climate, health, and ecosystem interactions / J. Fröhlich-Nowoisky [et al.] // *Atmospheric Res.* – 2016. – Vol. 182 – P. 346–376.
46. Fröhlich-Nowoisky, J. Biogeography in the air: fungal diversity over land and oceans / J. Fröhlich-Nowoisky [et al.] // *Biogeosciences*. – 2012. – Vol. 9, № 3. – P. 1125–1136.
47. Womack, A. M. Biodiversity and biogeography of the atmosphere / A. M. Womack, B. J. M. Bohannan, J. L. Green // *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* – 2010. – Vol. 365, № 1558. – P. 3645–3653.
48. A movement ecology paradigm for unifying organismal movement research / R. Nathan [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 2008. – Vol. 105, № 49. – P. 19052–19059.
49. A molecular approach to species identification of *Chenopodiaceae* pollen grains in surface soil / L.-J. Zhou [et al.] // *Am. J. Bot.* – 2007. – Vol. 94, № 3. – P. 477–481.
50. Jordano, P. Pollen, seeds and genes: the movement ecology of plants / P. Jordano // *Heredity*. – 2010. – Vol. 105, № 4. – P. 329–330.
51. Конференция сторон конвенции о биологическом разнообразии: Четырнадцатое совещание. – Шарм-эш-Шейх, Египет, 17–29 ноября 2018 г. – CBD/COP/14/L.28 27 November 2018.
52. Mitchell, R. J. Ecology and evolution of plant–pollinator interactions / R. J. Mitchell [et al.] // *Ann. Bot.* – 2009. – Vol. 103, № 9. – P. 1355–1363.
53. Brosi, B. J. The effects of forest fragmentation on bee communities in tropical countryside: Bee communities and tropical forest fragmentation / B. J. Brosi [et al.] // *J. Appl. Ecol.* – 2007. – Vol. 45, № 3. – P. 773–783.
54. How does climate warming affect plant–pollinator interactions? / S. J. Hegland [et al.] // *Ecol. Lett.* – 2009. – Vol. 12, № 2. – P. 184–195.
55. Applying Pollen DNA Metabarcoding to the Study of Plant–Pollinator Interactions / K. L. Bell [et al.] // *Appl. Plant Sci.* – 2017. – Vol. 5,

№ 6. – P. 1600124.

56. Detection of airborne genetically modified maize pollen by real-time PCR / S. Folloni [et al.] // *Mol. Ecol. Resour.* – 2012. – Vol. 12, № 5. – P. 810–821.

57. Ненашева, Г. И. Методологические аспекты мелиссопалинологических исследований медов / Г. И. Ненашева [и др.] // *Биотехнология и общество в XXI веке.* — Барнаул, 2015. — С. 217–220.

58. A DNA barcoding approach to identify plant species in multiflower honey / I. Bruni [et al.] // *Food Chem.* – 2015. – Vol. 170 – P. 308–315.

59. Meta-barcoding in combination with palynological inference is a potent diagnostic marker for honey floral composition / R. C. Laha [et al.] // *AMB Express.* – 2017. – Vol. 7, № 1. – P. 132.

60. Федотова, В. Г. Фенология аллергенных растений Санкт-Петербурга и Ленинградской области / В. Г. Федотова, Л. П. Достоевская, П. А. Лебедев // *Biosfera.* – 2017. – Т. 9, № 2. – С. 166–196.

61. Application of ITS2 Metabarcoding to Determine the Provenance of Pollen Collected by Honey Bees in an Agroecosystem / R. T. Rich-

ardson [et al.] // *Applications in Plant Sciences.* – 2015. – Vol. 3, № 1. – P. 1400066.

62. Taylor, B. Forensic Palynology: Spatial and Temporal Considerations of Spora Deposition in Forensic Investigations / B. Taylor, K. R. Skene // *Australian Journal of Forensic Sciences.* – 2003. – Vol. 35, № 2. – P. 193–204.

63. Brown, A. G. The use of forensic botany and geology in war crimes investigations in NE Bosnia / A. G. Brown // *Forensic Science International.* – 2006. – Vol. 163, № 3. – P. 204–210.

64. Mildenhall, D. C. Hypericum pollen determines the presence of burglars at the scene of a crime: An example of forensic palynology / D. C. Mildenhall // *Forensic Science International.* – 2006. – Vol. 163. – P. 231–235.

65. Wood, P. Pollen helps war crime forensics / P. Wood // *BBC NEWS.* – 9 September, 2004. – Mode of access: <http://news.bbc.co.uk/2/hi/science/nature/3640788.stm>. – Date of access: 30.08.2021.

66. Review and future prospects for DNA barcoding methods in forensic palynology / K. L. Bell [et al.] // *Forensic Science International: Genetics.* – 2016. – Vol. 21 – P. 110–116.

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

TRENDS IN MODERN PALYNOLOGY AND PROSPECTS OF USING DNA BARCODING FOR THE DIFFERENTIATION OF PLANTS BY POLLEN

¹Institute of Genetics and Cytology of NAS of Belarus
Minsk, 220072, the 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
Minsk, 220114, the Republic of Belarus

Classical palynology is based on the morphological description of pollen obtained using the light microscopy technique, which has along with its advantages a number of limitations. Due to the genetic study of mixtures of pollen and spores of different plant species, it will be possible to obtain more accurate identification of pollen species composition and to replace or effectively supplement morphological analysis with DNA analysis. The presented literature review demonstrates great potential of using pollen DNA barcoding in a number of areas of applied palynology.

Keywords: palynology, barcoding, pollen, pollen DNA, next generation sequencing.

Дата поступления в редакцию: 06 сентября 2021 г.

Н. И. Дубовец¹, Н. М. Казнина², О. А. Орловская¹, Е. А. Сычѐва¹

ПРОБЛЕМА ДЕФИЦИТА ЦИНКА В РАЦИОНЕ ПИТАНИЯ НАСЕЛЕНИЯ И БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К ЕЕ РЕШЕНИЮ

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

²Институт биологии — обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения Федерального исследовательского центра «Карельский научный центр Российской академии наук»
Россия, 185610, г. Петрозаводск, ул. Пушкинская, 11

В статье представлен обзор литературных данных, касающихся влияния дефицита цинка в продуктах питания на здоровье человека. Подчеркнут глобальный характер проблемы, охватывающей население не только развивающихся, но и развитых стран. Проанализированы результаты исследований, направленных на изучение влияния недостатка цинка на основные физиологические процессы культурных злаков, обеспечивающие их продуктивность. Рассматриваются современные подходы к биофортификации сельскохозяйственных культур микронутриентами и описаны достигнутые в этом направлении успехи. Сделан вывод, что для повышения питательной ценности зерна пшеницы, в том числе обогащения его цинком, оптимальным подходом является отдаленная гибридизация, сопряженная с использованием молекулярных маркеров.

Ключевые слова: дефицит цинка, здоровье, культурные злаки, физиологические процессы, продуктивность, питательная ценность зерна, генетическая биофортификация.

Введение

Микроэлементы играют фундаментальную роль в биохимических и физиологических процессах жизнедеятельности биологических систем. Основным их поставщиком для высших растений служит почва. Недостаток микроэлементов в почве, либо низкая их доступность для поглощения вследствие высокого содержания в почве кальция, ее заболачивания и защелачивания, снижения уровня pH (а такие почвы составляют около 50% земель, занятых посевами злаковых культур) приводят к существенным потерям урожая сельскохозяйственных культур, а также к ухудшению качества получаемой продукции. Это, в свою очередь, негативно отражается на здоровье человека и животных, причем наиболее опасным в этом плане считается дефицит цинка (Zn), что обусловлено его чрезвычайно важной и многоплановой ролью в клеточном метаболизме [1]. По оценкам Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), в мире от дефицита

микроэлементов, в особенности цинка (Zn) и железа (Fe), страдают более 2 млрд человек, что проявляется в общем ухудшении здоровья, анемии, низкой производительности труда, увеличении заболеваемости и уровня смертности. В первую очередь это касается развивающихся стран, где значительную часть рациона питания населения составляют злаки [2–4]. В связи с этим проблема дефицита микроэлементов (так называемый «скрытый голод») была недавно объявлена приоритетным направлением мировых исследований (<http://www.copenhagenconsensus.com>), что послужило триггером для поиска эффективных путей обогащения пищевых культур микронутриентами.

Недостаток Zn в почве традиционно компенсируют внесением высоких доз цинкостержащих минеральных удобрений, однако такой подход нередко приводит к увеличению содержания металла в почве и в растениях до токсичных значений. Альтернативой ему явля-

ется создание сортов, обладающих способностью даже в условиях значительного дефицита Zn в почве и в растениях осуществлять нормальную жизнедеятельность и давать высокие урожаи за счет усиленного поглощения этого микроэлемента и/или его активной метаболизации и более эффективного использования в обмене веществ. Тем не менее ощутимых результатов в этом направлении добиться пока не удалось вследствие недостатка знаний о влиянии дефицита цинка на протекание физиологических процессов у растений, а также о механизмах их устойчивости к этому виду стресса. Более эффективным на настоящий момент подходом к решению проблемы является генетическая биофортификация, включающая как традиционные методы селекции, основанные на генетической изменчивости целевого признака, так и современные технологии, нацеленные на идентификацию генов, ответственных за поглощение, транспорт и накопление микроэлементов в тканях растений, что открывает возможность проводить маркеропосредованную селекцию сортов с повышенной питательной ценностью [5].

Исходя из вышеизложенного, целью настоящего обзора явилось обобщение литературных данных о влиянии дефицита Zn на здоровье человека и на основные физиологические процессы культурных злаков, а также анализ состояния работ по генетической биофортификации злаковых культур с акцентом на биофортификацию цинком пшеницы, как одной из самых значимых продовольственных культур.

Влияние дефицита цинка на здоровье человека

Общее количество Zn в организме человека составляет 2–3 г, из которых почти 90% находится в мышцах и костях. Другие органы, содержащие значимые концентрации этого микроэлемента, включают простату, печень, желудочно-кишечный тракт, почки, кожу, легкие, мозг, сердце и поджелудочную железу [6]. На клеточном уровне 30–40% Zn локализовано в ядре, 50% — в цитозоле, а оставшаяся часть связана с мембранами [7]. Более 300 ферментов и 2 000 факторов транскрипции нуждаются в Zn для выполнения своих функций и поддержания стабильности своих структур. Выполняя в организме три основные биологические

функции — каталитическую, структурную и регуляторную, он является настолько важным элементом для здоровья человека, что даже небольшой его недостаток может привести к катастрофическим последствиям [8].

Впервые о дефиците Zn в организме человека заговорили в 1961 году, когда у иранских мужчин были диагностированы такие симптомы, как задержка роста, гипогонадизм, кожные аномалии и умственная отсталость, которые, как оказалось, связаны с недостатком этого микроэлемента в пище [9]. Позднее аналогичные клинические особенности были обнаружены у некоторых египетских пациентов [10]. Это послужило толчком для детального изучения клинических проявлений дефицита Zn у человека и выявления среди населения групп риска. По нынешним оценкам Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), около 2 млрд человек, живущих в развивающихся странах, страдают от дефицита Zn. Это обусловлено тем, что население этих стран питается преимущественно зерновыми белками, содержащими большое количество органических фосфатных соединений, которые в сочетании с Zn делают его недоступным для усвоения [11].

Следует, однако, отметить, что проблема дефицита Zn затрагивает не только развивающиеся, но и промышленно развитые страны. Так, по данным A. S. Prasad [12], около 30% здоровых, обеспеченных пожилых людей, живущих в развитых странах, также испытывают дефицит этого микроэлемента из-за повышенного молярного отношения фитата к цинку в их рационе, что в основном связано со снижением потребления богатых Zn продуктов, в частности, красного мяса. Кроме того, имеются сведения, что с возрастом происходит снижение эффективности абсорбции цинка [13].

Вследствие множества основных биохимических функций, выполняемых Zn в клетках человеческого тела, его дефицит оказывает влияние на функциональную активность многих органов и систем: пищеварительную, покровную, нервную, иммунную, скелетную, репродуктивную и т.д. [8]. При этом клинические проявления дефицита Zn зависят от возраста [14]. Так, в раннем младенчестве наиболее заметным симптомом является диарея. Помимо этого, дефицит Zn приводит к нару-

шению когнитивных функций, поведенческим проблемам, нарушению памяти, неспособности к обучению и атрофии нейронов. По мере взросления ребенка более частыми становятся проблемы с кожей. У детей школьного возраста часто встречаются алопеция, задержка роста и рецидивирующие инфекции [15]. Среди пожилых людей распространены хронические незаживающие язвы кожи и рецидивирующие инфекции [16]. Кроме того, со снижением концентрации Zn в глазу связана возрастная дегенерация желтого пятна, которая поражает почти 25% людей старше 65 лет, а на позднюю стадию заболевания приходится почти 50% случаев слепоты в Европе и Северной Америке [17].

Все перечисленные выше эффекты выявлены в контролируемых клинических испытаниях, продемонстрировавших положительный ответ на дополнительный прием Zn [15]. Огромный прогресс, достигнутый за последние пять десятилетий в понимании биохимической роли этого микроэлемента, привел к тому, что в настоящее время Zn является одобренным препаратом для лечения и поддерживающей терапии большого количества заболеваний.

В этом плане в первую очередь следует отметить, что использование Zn для лечения острой диареи у младенцев и детей в развивающихся странах спасло миллионы жизней [11].

Zn используют как альтернативное лечение при болезни Вильсона — фатальном наследственном заболевании, связанном с нарушением метаболизма меди и избыточным ее накоплением преимущественно в печени и центральной нервной системе. Препараты Zn (сульфат, окись, ацетат цинка) индуцируют металлотионины энтероцитов, обладающих высоким сродством к меди, что приводит к захвату меди из пищи, связыванию в эпителии кишечника, и препятствию абсорбции металла в системный кровоток с выделением избытка меди с калом [17].

Zn является единственным лекарством, которое эффективно снижает частоту инфекций и болевых кризов у пациентов с серповидноклеточной анемией.

Подтверждена целесообразность использования препаратов Zn и для снижения общей длительности широко распространенных сре-

ди населения всех возрастов острых респираторных заболеваний (грипп, аденовирусные инфекции и др.), в том числе для ослабления и купирования у пациента отдельных симптомов (насморк, заложенность носа, першение в горле, охриплость, кашель, боли в мышцах) [18]. Показано, что при условии начала лечения в течение 24 ч с момента появления симптомов, пастилки с ацетатом цинка сокращают продолжительность простуды на 50% [11]. Это обусловлено тем, что в поддержании противовирусного иммунитета участвуют 118 цинксодержащих белков, причем 11 из них необходимы для защиты от одноцепочечных РНК вирусов, в том числе от коронавируса SARS-CoV-2 [19].

Здесь уместно будет отметить, что пандемия COVID-19 заставила по-новому оценить важность вклада различных микронутриентов, и в первую очередь Zn, в поддержку врожденного иммунитета. Дело в том, что пандемия в наибольшей степени затрагивает пожилых пациентов с хроническими коморбидными патологиями, и совершенно очевидно, что пациенты с повышенным уровнем хронического воспаления относятся к группе риска более тяжелого течения COVID-19. В настоящее время не существует эффективных и безопасных способов фармакотерапии как COVID-19, так и хронических коморбидных патологий, поэтому микронутриентная поддержка врожденного иммунитета (включая снижение уровня хронического воспаления) является важнейшим условием снижения тяжести течения коронавирусной инфекции и ускорения реабилитации пациентов, перенесших COVID-19 [19].

Нельзя не упомянуть также, что при многих хронических заболеваниях, таких как атеросклероз, некоторые злокачественные новообразования, неврологические расстройства, аутоиммунные и возрастные дегенеративные заболевания, сопутствующий дефицит Zn может осложнять клинические проявления, отрицательно влиять на иммунологический статус, усиливать окислительный стресс и приводить к образованию воспалительных цитокинов [8]. Вследствие этого очень важно, чтобы статус Zn у пациента оценивался в любом случае и его дефицит подвергался корректировке, поскольку уникальные свойства этого микроэлемента могут иметь значительные терапев-

тические преимущества при упомянутых заболеваниях.

Что же касается всего населения, то совершенно очевидно, что включение в рацион богатых цинком продуктов позволит избежать возникновения многих распространенных заболеваний.

Влияние дефицита цинка на физиологические процессы и продуктивность культурных злаков

Проблема дефицита Zn в рационе питания человека, как уже отмечалось, тесно связана с недостатком этого микроэлемента в растительной пище, но и сами растения для нормальной физиологической и биохимической активности остро нуждаются в ежедневном потреблении оптимального количества Zn. Так, Zn незаменим для обеспечения роста и развития растения, что связано с его участием в синтезе триптофана, являющегося предшественником одного из наиболее важных гормонов роста — индолилуксусной кислоты (ИУК) [20]. Немаловажную роль играет этот элемент и в защите клеточных мембран от перекисного окисления липидов и белков, что определяется его способностью взаимодействовать с фосфолипидами и SH-группами мембранных белков, обеспечивая поддержание структурной и функциональной целостности мембран [21]. Доказана необходимость этого микроэлемента и для процесса деградации белков, поскольку некоторые протеазы представляют собой Zn-зависимые белки. Наконец, Zn является компонентом ДНК-связывающего домена под названием «цинковые пальцы» (zinc finger proteins), который входит в состав целой группы транскрипционных факторов, играющих ключевую роль в различных внутриклеточных процессах, включая связывание ДНК и РНК, белок-белковые и РНК-белковые взаимодействия, регуляцию апоптоза и др. [22]. Учитывая столь многогранную роль Zn, неудивительно, что его дефицит оказывает сильное негативное воздействие на растения.

Симптомы дефицита Zn у злаков относительно легко выявляются визуально: отмечается низкорослость растений, вызванная задержкой верхушечного роста (укорочение высоты междоузлий), окраска листьев становится желто-зеленой, затем они покрываются бурыми

пятнами и отмирают, а у молодых листьев обнаруживается межжилковый хлороз [20]. При этом, как показывает анализ литературных данных, торможение роста растений является следствием целого ряда структурно-функциональных изменений и нарушений. В частности, установлено, что недостаток металла негативно отражается на активности меристематических клеток, подавляя в 2–3 раза скорость их деления, а также нарушая растяжение и дифференциацию [23]. Отчасти это может быть связано со снижением активности цинк-зависимых ферментов, участвующих в дыхании (глицер-альдегид-3-фосфатдегидрогеназа, альдолаза), поскольку в период активного деления клеток повышается запрос на энергетические и пластические ресурсы, образуемые в ходе этого процесса [24]. Помимо этого, при дефиците Zn, как уже отмечалось, снижается уровень гормона роста ИУК.

Наряду с торможением роста недостаток Zn приводит к задержке развития злаков. В частности, обнаружено, что Zn играет важную роль в индукции процессов перехода от вегетативной фазы развития к генеративной, и при недостатке этого микроэлемента у злаков задерживается наступление фаз выхода в трубку и колошения, замедляется формирование репродуктивных органов. Полагают, что подобный эффект во многом связан с уменьшением активности белков с доменом «цинковые пальцы» (в том числе ряда транскрипционных факторов), участвующих в процессе формирования репродуктивной меристемы из вегетативной [25].

Существенное негативное влияние оказывает недостаток Zn и на работу фотосинтетического аппарата (ФСА). В ряде исследований было обнаружено, что при недостатке Zn у злаков значительно тормозится скорость фотосинтеза, что является следствием многочисленных изменений и/или нарушений в ФСА. В первую очередь отмечают уменьшение в этих условиях содержания хлорофиллов, визуально выявляемое по хлорозу листьев [26]. Подобный эффект связывают со снижением активности некоторых ферментов, участвующих в биосинтезе зеленых пигментов [27]. Кроме того, обнаружено, что дефицит металла вызывает у злаков различные изменения в ультраструктуре хлоропластов, такие как дефор-

мация пластид, нарушение структуры внешней мембраны и мембран тилакоидов, деградация ламелл, а в некоторых случаях наблюдали даже полное разрушение ультраструктуры хлоропластов [28].

Некоторые авторы связывают замедление скорости фотосинтеза при дефиците Zn с изменениями, затрагивающими световую фазу этого процесса. В частности, обнаружено, что при недостатке металла у кукурузы замедляется фотосинтетический транспорт электронов, а у мягкой пшеницы снижается потенциальная и реальная квантовая эффективность фотосистемы II [26]. По последним данным, это может быть связано со снижением активности цинксодержащего фермента — карбоангидразы, разные формы которой обнаружены во многих клеточных органеллах растений, в том числе и в хлоропластах [29].

Необходимо также отметить важную роль карбоангидразы для темновых реакций фотосинтеза, а именно для обеспечения рибулозобисфосфаткарбоксилазы (РУБИСКО) молекулами CO_2 [29]. Оказалось, что у цинк-дефицитных растений снижение активности карбоангидразы приводит к подавлению карбоксилазной активности РУБИСКО, что отрицательно отражается на скорости фотосинтеза.

Еще одной причиной замедления скорости фотосинтеза у злаков в условиях недостатка Zn является развитие в клетке окислительного стресса. Zn, как известно, играет заметную роль в регуляции генерации активных форм кислорода и в предотвращении нарушений ими клеточных мембран [30], что связано с его функцией сохранения структурной целостности мембран. Однако, помимо этого, Zn влияет на активность ряда антиоксидантных ферментов, в частности, на Cu/Zn-супероксиддисмутазу (Cu/Zn-СОД) — один из ключевых ферментов антиоксидантной защиты, в состав которого входит этот металл [30]. Обнаружено, что при дефиците Zn активность Cu/Zn-СОД у ржи снижается в 2–3 раза, а у твердой пшеницы — более, чем в 5 раз [31]. Зафиксировано снижение активности и других антиоксидантных ферментов, а также неферментативных компонентов антиоксидантной системы, что приводит к увеличению содержания активных форм кислорода в клетках и развитию в них окислительного стрес-

са, что в свою очередь вызывает структурные и функциональные нарушения в клеточных мембранах, негативно отражаясь на процессе фотосинтеза. По мнению ряда авторов, именно нарушение окислительно-восстановительных процессов у растений при недостатке Zn служит основной причиной его отрицательного влияния на фотосинтез [32].

Одним из наиболее ярко выраженных внешних симптомов дефицита Zn у растений является потеря тургора листьями и их увядание. Тем не менее до сих пор роль этого микроэлемента в водном обмене остается слабо изученной. Отмечается лишь, что у цинк-дефицитных растений замедлена интенсивность транспирации, что в значительной степени связано с частичным закрытием устьичной щели. Полагают, что сильный стресс, вызванный недостатком этого микроэлемента, приводит к снижению содержания в замыкающих клетках калия и, как следствие, к нарушению регуляции открытия устьиц [33].

Все перечисленные негативные воздействия дефицита Zn на растения злаков в конечном итоге приводят к снижению их семенной продуктивности. При этом помимо уменьшения общего урожая семян наблюдается отрицательное влияние и на отдельные компоненты семенной продуктивности. В частности, обнаружено уменьшение числа репродуктивных побегов, размеров колоса, количества колосков и зерен в колосе, массы зерновки и 1 000 зерен [34]. Как показывает анализ литературы, такого рода изменения являются, с одной стороны, следствием нарушений физиолого-биохимических процессов, с другой — отрицательного эффекта недостатка Zn на формирование органов цветка, процессы опыления и оплодотворения растений. В частности, при дефиците металла происходит нарушение микроспорогенеза и гаметогенеза, выявлены изменения морфологии органов цветка: уменьшение размеров пестика, тычиночной нити и пыльников; обнаружена задержка формирования пыльцевой трубки и уменьшение фертильности пыльцы, а также нарушение формирования пыльцевых зерен [35, 36]. Вопрос о причинах указанных изменений пока остается открытым. Предположительно, они могут быть связаны с уменьшением активности факторов транскрипции с доменом «цинковые пальцы»,

которые участвуют в развитии и функционировании пыльников и пыльцевых зерен [37].

Таким образом, исходя из анализа литературных данных, можно сделать вывод, что в основе негативных эффектов недостатка Zn на физиологические процессы у растений, в первую очередь, лежит снижение активности большого количества ферментов, в состав которых входит этот микроэлемент или участвует в их активации, а также транскрипционных факторов, содержащих в своем составе домен «цинковые пальцы». Это приводит к целому ряду изменений в клеточном метаболизме, включая нарушение гормонального баланса (уменьшение содержания ИУК), снижение содержания фотосинтетических пигментов и квантовой эффективности фотосистемы II, подавление скорости темновых реакций фотосинтеза, а также отток калия из замыкающих клеток устьиц, приводящий к нарушению регуляции устьичных движений. При сильном дефиците Zn в клетках резко возрастает количество активных форм кислорода и развивается окислительный стресс, вызывающий увеличение проницаемости клеточных мембран. Указанные изменения приводят к тому, что у растений тормозится рост и развитие, замедляется скорость фотосинтеза, нарушается водный обмен, и, как следствие, заметно снижается их продуктивность, что ведет к большому потере урожая.

Генетическая биофортификация как оптимальный подход к обогащению пищевых культур микронутриентами

Биофортификация — это повышение питательной ценности сельскохозяйственных культур за счет обогащения витаминами и микроэлементами. Различают агрономическую и генетическую биофортификации [38]. Первая основана на применении удобрений, содержащих микроэлементы, которые вносятся либо непосредственно в почву, либо используются в качестве внекорневой подкормки. Показано, что применение цинксодержащих удобрений является эффективным способом повышения содержания этого микроэлемента в зерне культурных злаков, однако данная стратегия сопряжена с постоянными денежными вложениями, что ограничивает возможности ее использования в развивающихся странах [39].

С экономической точки зрения более выгодной является генетическая биофортификация, основанная на традиционных методах селекции [40]. Интенсивные работы в этом направлении по обогащению пищевых культур цинком, железом и витамином А ведутся начиная с 2003 года в рамках программы HarvestPlus, сформированной Консультативной группой по международным сельскохозяйственным исследованиям (CGIAR) в ответ на признание дефицита микронутриентов в питании человека глобальной проблемой.

В годовом отчете HarvestPlus за 2018 год содержится информация о создании таких биофортифицированных культур, как маниок, батат и кукуруза с повышенным содержанием витамина А; фасоль и просо с повышенным содержанием железа; кукуруза, пшеница и рис с повышенным содержанием цинка. Примерно 7,6 млн мелких фермерских хозяйств в странах Азии, Африки и Латинской Америки выращивали в 2018 году поставляемые HarvestPlus биофортифицированные культуры, что принесло пользу примерно 38 млн членов фермерских семей, причем эта цифра не учитывает людей, потреблявших биообогащенные культуры, купленные на рынках, или пищевые продукты, приготовленные из этих культур [41]. В 2019 году количество фермерских хозяйств, охваченных биофортифицированными культурами, возросло до 8,5 млн [42], а к концу 2020 года этот показатель достиг 9,7 млн, что на 14% больше, чем в 2019 году [43]. В качестве конкретного достижения программы за прошедший год можно привести реализацию в Пакистане биофортифицированного цинком сорта пшеницы Акбар-2019, разработанного HarvestPlus совместно с CIMMYT. По сравнению с традиционными сортами Акбар-2019 содержит на 26% больше цинка и помимо этого характеризуется высокой урожайностью и устойчивостью к ржавчине — наиболее вредоносной болезни пшеницы в Пакистане. Здесь уместно будет отметить, что Пакистан является страной с одним из самых высоких в мире уровней потребления пшеницы, на долю которой приходится 72% ежедневного потребления калорий [43].

В целом, на сегодняшний день в рамках программы HarvestPlus реализовано или проходят испытания более 290 биофортифицированных

сортов двенадцати основных продовольственных культур, которыми охвачено более 33 млн человек в 60 странах мира. Предполагается, что к 2030 году биообогащенными продуктами питания будет обеспечен 1 млрд человек.

Другим направлением исследований в рамках генетической биофортификации является трансгенез. Работы этого плана сфокусированы на достижении гиперэкспрессии генов, ответственных за поглощение, транспорт и накопление микроэлементов в тканях растений, причем модельным объектом для этих исследований является рис [44]. Так, группой испанских ученых были созданы трансгенные растения риса, способные продуцировать повышенное количество таких транспортеров металлов, как никотианамин (NA) и 2'-дезоксимугеновая кислота (DMA), что привело к накоплению в эндосперме в 4 раза больше железа и в 2 раза больше цинка [45]. Схожие результаты были получены в Японии: Masuda et al. [46] увеличили накопление ферритина, являющегося внутриклеточным депо-белком для ионов железа, а также усилили поток металла в эндосперм риса за счет сверхэкспрессии транспортера железа (II) — никотианамин OsYSL2. В итоге у трансгенных растений произошло повышение содержания в зерне железа (в 6 раз в теплице и в 4,4 раза в поле) и цинка (в 1,6 раза). На основании полученных данных авторы пришли к выводу, что модификации нескольких генов, участвующих в гомеостазе железа и цинка, более эффективны для обогащения зерновых культур микроэлементами. Особого внимания заслуживает тот факт, что устранение в рисе дефицита железа одновременно приводит к увеличению накопления цинка. Помимо представленных выше данных, об этом же свидетельствуют работы Aung et al. [47], направленные на создание в Мьянме, где 70% населения страдает от дефицита железа, трансгенной линии риса, обогащенной этим элементом. Авторам удалось добиться сверхэкспрессии гена никотианаминсинтазы HvNAS1 для усиления транспорта железа в вегетативных частях растения, гена-транспортера Fe (II) никотианамин OsYSL2 для усиления оттока железа в эндосперм и гена запасного белка Fe SoyferH2 для увеличения накопления железа в эндосперме. В итоге созданные трансгенные растения риса накопили

более чем в 3,4 раза больше Fe, а также в 1,3 раза больше цинка по сравнению с исходным сортом. Это указывает на наличие общих генетико-физиологических механизмов, участвующих в поглощении микроэлементов растениями из почвы, их транспорте и накоплении в вегетативных органах с последующей ремобилизацией в зерно.

Несмотря на результативность метода генной инженерии, в литературе отмечается, что с точки зрения сочетания экономичности и эффективности он в значительной мере уступает традиционным методам селекции, основанным на генетической изменчивости [48], однако и тут есть свои ограничения. Далеко не все окультуренные виды в процессе селекции сохранили широкий диапазон изменчивости признаков. В особенности это касается пшеницы, утратившей в ходе длительного селекционного процесса многие присущие дикорастущим видам ценные аллели, в том числе ответственные за высокое содержание микроэлементов. Так, концентрация цинка (Zn) и железа (Fe) в зерне современных сортов составляет в среднем 25 и 35 мг/кг соответственно, в то время как у образцов дикой полбы (*T. dicoccoides*) — 61 и 46 мг/кг [49]. Такая же тенденция отмечена и для других диких сородичей пшеницы, принадлежащих родам *Triticum* и *Aegilops*. В связи с этим большие надежды в контексте решения проблемы дефицита микроэлементов возлагаются на отдаленную гибридизацию.

Значительный оптимизм в этом плане внушает выявление у *T. dicoccoides* ($2n = 4x = 28$, геномная формула ВВВ^uА^u), или дикой двузернянки, локуса *Gpc-B1*, влияющего на содержание белка в зерне, а также, как затем оказалось, на концентрацию железа и цинка. Локус был картирован в коротком плече хромосомы 6В, а при детальном уточнении границ участка его локализации была найдена последовательность, идентифицированная как ген, кодирующий НАС-доменный белок [50]. НАС-белки, принадлежащие к одному из самых больших и специфичных для растений семейств НАС-факторов транскрипции, участвуют в регуляции различных программ развития растений, контроле защитных реакций на биотические и абиотические стрессоры, играют важную роль в процессе старения растений [13].

При сравнении нуклеотидных последова-

тельностью гена *Gpc-B1* у сорта пшеницы Langdon и созданной на его основе интрогрессивной линии, несущей генетический материал *T. dicoccoides*, было обнаружено, что в позиции 933 у сорта имеется вставка 1 п. н., приводящая к сдвигу рамки считывания. Рассчитанный для этого аллеля белок был неактивным [51].

Определение нуклеотидной последовательности локуса позволило разработать молекулярные маркеры, способные выявлять функционально активные и/или неактивные аллели *Gpc-B1* и проводить генетический скрининг образцов коллекций на их наличие. В результате такого скрининга функциональный аллель *Gpc-B1* был обнаружен у 42 образцов *T. dicoccoides* и у 17 из 19 изученных образцов *T. dicoccut*, или культурной полбы. Напротив, 57 сортов твердой пшеницы и 34 сорта мягкой пшеницы или содержали инсерцию 1 п. н., или имели делецию гена — частичную или полную, и, как следствие, неактивный продукт или его отсутствие [52]. Это еще более упрочило позиции отдаленной гибридизации в плане повышения питательной ценности зерна пшеницы.

Первыми гексаплоидными формами пшеницы, в которые целенаправленно были введены функциональные аллели *Gpc-B1*, стали созданные в США сорт Glupro (ND-643) и селекционные линии ND-683 и ND-645 [53]. В Канаде посредством создания дигаплоидов и применения маркер-опосредованного отбора было получено три коммерческих сорта яровой мягкой пшеницы, которые незначительно превосходили или не отличались по урожайности от сортов с отсутствием функциональных *Gpc-B1* аллелей, но все они имели более высокий процент белка в зерне (от 13,4 до 16,1%) и созревали на два–три дня раньше [54].

С целью уточнения эффектов функциональных аллелей гена *Gpc-B1* на содержание белка в зерне в разных генетических средах и определения их влияния на другие признаки, в разных странах мира (США, Аргентина, Индия, Китай, Австралия и др.) были созданы и изучены серии почти изогенных линий на основе мягкой и твердой пшеницы. Обобщение полученных данных позволило сделать вывод, что интрогрессия функционального *Gpc-B1* аллеля в геном культурных пшениц

обоих уровней плоидности приводит к повышению содержания белка и ключевых минералов в зерне, улучшению уборочного индекса азота, увеличению сбора белка с единицы площади без ощутимого снижения урожая зерна, что свидетельствует о высокой эффективности данной стратегии, включающей применение молекулярных маркеров, в плане повышения питательной ценности культуры [55].

Поиск иных локусов, связанных с накоплением микроэлементов в зерне, проведенный на диплоидном А-геноме пшеницы, привел к идентификации двух QTL на хромосомах 2А и 7А, влияющих на содержание Fe, и одного QTL на хромосоме 7А — на содержание Zn [56]. Другими исследователями в картированной популяции *T. monosoccut* основной QTL, связанный с высоким содержанием в зерне цинка, железа, меди и марганца, был выявлен на хромосоме 5В [57]. В ходе изучения популяции из 80 дигаплоидных линий мягкой пшеницы было идентифицировано 4 QTL, ассоциированных с содержанием Zn, локализованных на хромосомах 3D, 4В, 6В и 7А [58]. При этом каждый QTL оказывал относительно небольшое влияние на признак, но сочетание в одном генотипе четырех локусов увеличивало концентрацию металла на 23%. По мнению авторов, хотя это и свидетельствует о перспективности пирамидирования генов для повышения содержания микроэлемента в зерне, однако более результативным будет использование отдельных QTL с большими эффектами.

Между тем выявление таких QTL с использованием традиционного картирования ограничено необходимостью создания двуродительских популяций и низким разрешением позиционирования QTL. В последнее время для анализа генетического контроля сложных признаков пшеницы стали применять технологию поиска полногеномных ассоциаций (GWAS), преимуществом которой является более высокий уровень разрешения и охвата аллелей, а также возможность использования больших наборов анализируемых образцов. В селекционном центре CIMMYT эта технология впервые была использована для анализа генетики накопления в зерне Zn на материале 330 линий мягкой пшеницы [59]. Проведенный GWAS-анализ выявил 39 ассоциаций маркер-

признак для накопления Zn в зерне. На хромосомах 2 и 7 были обнаружены два района QTL с большим эффектом на исследуемый признак, связанные с генами-кандидатами (среди них мотив «цинковые пальцы» и гены связывания ионов металлов). По мнению авторов, использование GWAS-анализа существенно повысит результативность работ по выявлению локусов, ответственных за высокое качество зерна, а разработанные к ним на основе ПЦР маркеры позволят проводить эффективный отбор доноров целевых признаков из разных генетических ресурсов, включая дикорастущих сородичей пшеницы, что в конечном итоге значительно ускорит прогресс в области биофортификации этой культуры микронутриентами.

Заключение

Представленные в обзоре литературные данные свидетельствуют о том, что проблема дефицита цинка в рационе питания имеет глобальный характер и затрагивает население не только развивающихся, но и развитых стран. Недостаток этого микроэлемента в организме вызывает целый ряд специфических заболеваний, а также осложняет течение самых распространенных болезней, существенно снижая качество жизни человека. Особенно остро эта проблема стоит в странах, где значительную часть рациона питания населения составляют злаки (рис, пшеница, кукуруза), характеризующиеся низким содержанием всех микронутриентов, включая Zn. Исходя из этого, решение проблемы заключается в разработке оптимальной технологии биофортификации зерновых культур микроэлементами. Интенсивные работы в этом направлении ведутся с начала 2000-х годов. Использование в рамках программы HarvestPlus технологии, основанной на традиционных методах селекции, позволило создать 290 биофортифицированных сортов 12 основных продовольственных культур, которые реализованы в 60 странах Азии, Африки и Латинской Америки. Однако эта технология не подходит для культур, современные сорта которых характеризуются низким уровнем изменчивости, в особенности это касается пшеницы. В этом случае большие надежды возлагаются на отдаленную гибридизацию с применением маркер-опосредованной селекции. О перспективности такого

подхода свидетельствуют результаты интрогрессии в геном пшеницы дикого аллеля гена *Gpc-B1* от *T. dicoccoides*. Дальнейшему прогрессу в этом направлении будет способствовать расширение пула идентифицированных ключевых генов, вовлеченных в процессы поглощения, транспорта и накопления микроэлементов в тканях растений, и их пирамидирование в одном генотипе в результате контролируемых с помощью молекулярных маркеров скрещиваний. Стремительное развитие молекулярных технологий предоставляет широкие возможности для реализации такого подхода.

Статья подготовлена в ходе исследований, выполняемых при поддержке БРФФИ (грант № Б20Р-240) и РФФИ (грант Бел_а № 20-516-00016).

Список использованных источников

1. Hotz, C. Assessment of the risk of zinc deficiency in populations and options for its control / C. Hotz, K. H. Brown // *Food & Nutrition Bulletin*. – 2004. – Vol. 25, № 1. – P. 94–204.
2. Welch, R. M. Breeding for micronutrient in staple food crops from a human nutrition perspective / R. M. Welch, R. D. Graham // *J. Exp. Bot.* – 2004. – Vol. 55, № 396. – P. 353–364.
3. Sanchez, P. A. “Cutting World Hunger in Half.” / P. A. Sanchez, M. S. Swaminathan // *Science*. – 2005. – Vol. 307, № 5708. – P. 357–359.
4. Cakmak, I. Enrichment of cereal grains with zinc: Agronomic or genetic biofortification? / I. Cakmak // *Plant Soil*. – 2008. – Vol. 302, № 1. – P. 1–17.
5. Nutritious subsistence food system / R. D. Graham [et al.] // *Advances in Agronomy*. – 2007. – Vol. 92, № 1. – P. 1–74.
6. Kinetic analysis of zinc metabolism and its regulation in normal humans / M. E. Wastney [et al.] // *Am. J. Physiol.* – 1986. – Vol. 251, №2. Pat.2. – P. 398–408.
7. Vallee, B. L. The biochemical basis of zinc physiology / B. L. Vallee, K. H. Falchuk // *Physiol. Rev.* – 1993. – Vol. 73, № 1. – P. 79–118.
8. Zinc and human health: an update / C. T. Chasapis [et al.] // *Arch Toxicol.* – 2012. – Vol. 86, № 4. – P. 521–534
9. Prasad, A. S. Syndrome of iron deficiency anemia, hepatosplenomegaly, hypogonadism, dwarfism and geophagia / A. S. Prasad, J. A. Hal-

- sted, M. Nadimi // *Am. J. Med.* – 1961. – Vol. 31. № 4. – P. 532–546.
10. Zinc metabolism in patients with the symptoms of iron deficiency, anaemia, hepatosplenomegaly, dwarfism and hypogonadism / A. S. Prasad [et al.] // *J. Lab. Clin. Med.* – 1963. – Vol. 61, № 6. – P. 537–549.
11. Prasad, A. S. Discovery of Zinc for Human Health and Biomarkers of Zinc Deficiency / A. S. Prasad // *Molecular, Genetic, and Nutritional Aspects of Major and Trace Minerals*, ed. J. F. Collins. Academic Press, 2017, P. 241–260.
12. Zinc intake and status in middle-aged and older European subjects: The ZENITH study / M. Andriollo-Sanchez [et al.] // *Eur. J. Clin. Nutr.* – 2005. – Vol. 59, № 1. – P. 37–41.
13. Zinc and its importance for human health: An integrative review / N. Roohani [et al.] // *J. Res. Med. Sci.* – 2013. – Vol. 18, № 2. – P. 144–157.
14. Hambidge, K. M. Zinc. / K. M. Hambidge, C. E. Casey, N. F. Krebs // *Trace Elements in Human and Animal Nutrition*. Mez W., editor. – Orlando: Academic Press; 1986. – P. 1–37.
15. Assessment of the risk of zinc deficiency in populations and options for its control / K. H. Brown [et al.] // *Food Nutr Bull.* – 2004. – Vol. 25. – P. 99–203.
16. Zinc content of human retinal pigment epithelium decreases with age and macular degeneration but superoxide dismutase activity increases / D. A. Newsome [et al.] // *J. Trace Elem. in Experimental Med.* – 1996. – Vol. 8, № 4. – P. 193–199.
17. Федеральные клинические рекомендации по оказанию медицинской помощи детям с болезнью Вильсона. – 2013. – URL: <http://zdravalt.ru/upload/iblock/51e/51e5b01d840382bc60d6c964efff2a6b.pdf> (дата обращения 09.03.2021).
18. Об использовании цинка и витамина С для профилактики и адъювантной терапии острых респираторных заболеваний / О. А. Громова [с соавт.] // *Терапия* – 2017. – №1 (11). – С. 36–46.
19. О перспективах использования микронутриентов в терапии коронавирусной инфекции у пациентов с коморбидной патологией / О. А. Громова [с соавт.] // *PMЖ «Медицинское обозрение»*. – 2020. – № 8 – С. 504–510.
20. Zinc in plants / M. R. Broadley [et al.] // *New Phytologist*. – 2007. – Vol. 173. – P. 677–702.
21. Role of Zn nutrition in membrane stability, leaf hydration status, and growth of common bean grown under soil moisture stress / S. Ghanepour [et al.] // *J. Bio. & Env. Sci.* – 2015. – Vol. 6, № 4. – P. 9–20.
22. Alloway, B. J. Zinc in soil and crop nutrition / B. J. Alloway. – Brussels, Paris: IZA and IFA, 2008. – 136 p.
23. Internal zinc accumulation is correlated with increased growth in rice suspension culture / B. Hossian [et al.] // *J. Plant Growth Regul.* – 1997. – Vol. 16, № 4. – P. 239–243.
24. Spatial-temporal analysis of zinc homeostasis reveals the response mechanisms to acute zinc deficiency in *Sorghum bicolor* / Y. Li [et al.] // *New Phytologist*. – 2013. – Vol. 200, № 4. – P. 1102–1115.
25. Colasanti, J. The indeterminate gene encodes a zinc finger protein and regulates a leaf-generated signal required for the transition to flowering in maize / J. Colasanti, Z. Yuan, V. Sundaresan // *Cell*. – 1998. – Vol. 93, № 4. – P. 593–603.
26. Wang, H. Photosynthetic rate, chlorophyll fluorescence parameters, and lipid peroxidation of maize leaves as affected by zinc deficiency / H. Wang, J. Y. Jin // *Photosynthetica*. – 2005. – Vol. 43, № 4. – P. 591–596.
27. Balashouri, P. Effect of zinc on germination, growth and pigment content and phytomass of *Vigna radiata* and *Sorghum bicolor* / P. Balashouri // *J. Ecobiol.* – 1995. – Vol. 7, № 2. – P. 109–114.
28. Differential changes in photosynthetic capacity, 77 K chlorophyll fluorescence and chloroplast ultrastructure between Zn-efficient and Zn-inefficient rice genotypes (*Oryza sativa*) under low zinc stress / W. Chen [et al.] // *Physiol. Plantarum*. – 2008. – Vol. 132, № 1. – P. 89–101.
29. Карбоангидразы фотосинтезирующих клеток высших растений / Н. Н. Руденко [с соавт.] // *Биохимия*. – 2015. – Т. 80, Вып. 6. – С. 798–813.
30. Cakmak, I. Possible roles of zinc in protecting plant cells from damage by reactive oxygen species / I. Cakmak // *New Phytol.* – 2000. – Vol. 146, № 2. – P. 185–205.
31. Morphological and physiological differences in the response of cereals to zinc deficiency / I. Cakmak [et al.] // *Euphytica*. – 1998. – Vol. 100, № 1–3. – P. 349–357.
32. Höller, S., Zinc deficiency differentially

- affects redox homeostasis of rice genotypes contrasting in ascorbate level / S. Höller, A. Meyer, M. Frei // *J. Plant Physiol.* – 2014. – Vol. 171, № 18. – P. 1748–1756.
33. Sharma, P. N. Zinc requirement for stomatal opening in cauliflower / P. N. Sharma, A. Tripathi, S. S. Bisht // *Plant Physiol.* – 1995. – Vol. 107, № 3. – P. 751–756.
34. Physiological responses and Yield of wheat plants in zinc-mediated alleviation of drought stress / D. Ma [et al.] // *Frontiers in Plant Sci.* – 2017. – Vol. 8. – Article number: 860.
35. Pandey, N. Zinc is critically required for pollen function and fertilization in lentil / N. Pandey, G. Pathak, C. P. Sharma // *J. Trace Elem. Med. Biol.* – 2006. – Vol. 20, № 2. – P. 89–96.
36. Zinc deficiency and anther development in maize / P. N. Sharma [et al.] // *Plant Cell Physiol.* – 1987. – Vol. 28, № 1. – P. 11–18.
37. Genome-wide identification of C₂H₂ zinc-finger gene family in rice and their phylogeny and expression analysis / P. Agarwal [et al.] // *Plant Mol. Biol.* – 2007. – Vol. 65, № 4. – P. 467–485.
38. Biofortification of durum wheat (*Triticum turgidum* L. ssp. durum (Desf.) Husnot) grains with nutrients / I. M. Pataco [et al.] // *J. of Plant Interactions*, 2017 Vol. 12, № 1, P. 39–50.
39. Cakmak, I. Agronomic biofortification of cereals with zinc: a review / I. Cakmak, U. B. Kutman // *European Journal of Soil Science.* – 2018. – Vol. 69, № 1. – P. 172–180.
40. Introgression of the high grain protein gene Gpc-B1 in an elite wheat variety of Indo-Gangetic Plains through marker assisted backcross breeding / M. K. Vishwakarma [et al.] // *Curr. Plant Biol.* – 2014. – Vol. 1, № 1. – P. 60–67.
41. Catalyzing Biofortified Food Systems: 2018 Annual Report [Электронный ресурс]. – 2018. – URL: <https://www.harvestplus.org/knowledge-market/publications> (дата обращения 20.09.2019)
42. Getting Biofortified Food On Everyone's Plate: 2019 Annual Report [Электронный ресурс]. – 2019. – URL: <https://www.harvestplus.org/knowledge-market/publications> (дата обращения 10.03.2020)
43. Responding to Crisis, Building Resilience: 2020 ANNUAL REPORT [Электронный ресурс]. – 2018. – URL: <https://www.harvestplus.org/sites/default/files/HarvestPlus2020.pdf> (дата обращения 27.08.2021)
44. Biofortified indica rice attains iron and zinc nutrition dietary targets in the field / K. R. Trijatmiko [et al.] // *Sci. Rep.* – 2016. – Vol. 6, Article number: 19792.
45. Phytosiderophores determine thresholds for iron and zinc accumulation in biofortified rice endosperm while inhibiting the accumulation of cadmium / R. Banakar [et al.] // *J. Exp. Bot.* – 2017. – Vol. 68, Article number: 17. – P. 4983–4995.
46. Iron biofortification in rice by the introduction of multiple genes involved in iron nutrition / H. Masuda [et al.] // *Sci. Rep.* – 2012. – Vol. 2, Article 543.
47. Iron biofortification of Myanmar rice / M. S. Aung [et al.] // *Front. Plant Sci.* – 2013. – Vol. 4, Article number: 158.
48. Biofortification strategies to increase grain zinc and iron concentrations in wheat / G. Velu [et al.] // *J. Cer. Sci.* – 2014. – Vol. 59, № 3. – P. 365–372.
49. *Triticum dicoccoides*: An important genetic resource for increasing zinc and iron concentration in modern cultivated wheat / I. Cakmak [et al.] // *Soil Sci. Plant Nutr.* – 2004. – Vol. 50, № 7. – P. 1047–1054.
50. Uauy, C. The high grain protein content gene Gpc-B1 accelerates senescence and has pleiotropic effects on protein content in wheat / C. Uauy, J. C. Brevis, J. Dubcovsky // *J. Exp. Bot.* – 2006. – Vol. 57, № 11. – P. 2785–2794.
51. NAC proteins: regulation and role in stress tolerance / S. Puranik [et al.] // *Trends Plant Sci.* – 2012. – Vol. 17, № 6. – P. 369–381.
52. A NAC gene regulating senescence improves grain protein, zinc, and iron content in wheat / C. Uauy [et al.] // *Science.* – 2006. – Vol. 314, № 5803. – P. 1298–1301.
53. Mesfin, A. RFLP markers associated with high grain protein from *Triticum turgidum* L. var. *dicoccoides* introgressed into hard red spring wheat / A. Mesfin, R. Froberg, J. A. Anderson // *Crop Sci.* – 1999. – Vol. 39, No. 2. – P. 508–513.
54. Fox, S. L. Somerset hard red spring wheat / S. L. Fox, D. G. Humphreys, B. D. McCallum // *Can. J. of Plant Sci.* – 2006. – Vol. 86, № 1. – P. 163–167.
55. Рибалка, О. І. GPC-B1 (*NAM-B1*) ген як новий генетичний ресурс у селекції пшениці на підвищення вмісту білка в зерні та мікроелементів / О. І. Рибалка, Б. В. Моргун, С. С. Поліщук // *Физиология растений и гене-*

тика. – 2018. – Т. 50, № 4. – С.279–298.

56. Mapping of quantitative trait loci for grain iron and zinc concentration in diploid a genome wheat / V. K. Tiwari [et al.] // J. Hered. – 2009. – Vol.100, № 6. – P. 771–776.

57. Natural variation and identification of micro-elements content in seeds of Einkorn Wheat (*Triticum monococcum*) / H. Ozkan [et al.] // Proc. 7th Intern. Wheat Conf., 27 Nov.-2 Dec. 2005, Mardel Plata, Argentina. – P. 455–462.

58. Quantitative trait loci analysis of zinc efficiency and grain zinc concentration in wheat using whole genome average interval mapping / Y. Genc [et al.] // Plant Soil. – 2009. – Vol. 314, № 1-2. – P.49–66.

59. Genetic dissection of grain zinc concentration in spring wheat for mainstreaming biofortification in CIMMYT wheat breeding / G. Velu [et al.] // Scientific Reports. – 2018. – Vol. 8. – Article number: 13526.

N. I. Dubovets¹, N. M. Kaznina², O. A. Orlovskaya¹, E. A. Sycheva¹

PROBLEM OF ZINC DEFICIENCY IN A DIET OF THE POPULATION AND BIOTECHNOLOGICAL APPROACHES TO ITS SOLUTION

¹State Scientific Institution

“Institute of Genetics and Cytology of NAS of Belarus”

27 Akademicheskaya St., 220072 Minsk, Republic of Belarus

e-mail: N.I.Dubovets@igc.by

²Institute of Biology of the Karelian Research Centre, Russian Academy of Sciences

11 Pushkinskaya St., 185610 Petrozavodsk, Russia

The article provides an overview of the literature on the impact of zinc deficiency in food on human health. The global nature of the problem is emphasized, covering the population of not only developing, but also developed countries. The study results have been analyzed aimed at investigating the effect of zinc deficiency on the main physiological processes of cultivated cereals, ensuring their productivity. Modern approaches to the biofortification of agricultural crops with micronutrients are considered and the success achieved in this direction is described. It was concluded that distant hybridization coupled with the use of molecular markers is an optimal approach to increasing the nutritional value of wheat grain, including its enrichment with zinc.

Keywords: zinc deficiency, health, cereals, physiological processes, productivity, nutritional value of grain, genetic biofortification.

Дата поступления статьи: 15 сентября 2021 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 ($q_{св}$);
- 5) обозначения химических элементов и соединений (P, H₂O);
- 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 31

Ответственный за выпуск *Е. М. Селихова*
Переводчик *М. Г. Пыжова*

Подписано в печать 08.12.2021. Формат 60×84^{1/8}. Бумага офсетная. Гарнитура Times.
Печать цифровая. Усл. печ. л. 19,07. Уч.-изд. л. 15,56. Тираж 100 экз. Заказ № 2795.

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.