

ISSN 1999-9127

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

МОЛЕКУЛЯРНАЯ И ПРИКЛАДНАЯ ГЕНЕТИКА

**СБОРНИК НАУЧНЫХ ТРУДОВ
ТОМ 36**

Издается с 2005 года
Выходит два раза в год

Минск
2024

УДК [577.21+575] (082)

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, 2024. – Т. 36. – 176 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;
О. Ю. Баранов, К. У. Вильчук, С. И. Гриб, Е. В. Гузенко, Н. И. Дубовец,
А. Н. Евтушенков, А. П. Ермишин, А. И. Ковалевич, С. А. Красный, В. А. Лемеш,
С. А. Лихачёв, Н. П. Максимова, М. Е. Михайлова, П. М. Морозик, И. Б. Моссэ,
М. Е. Никифоров, В. Е. Падутов, Ф. И. Привалов, В. Н. Решетников, В. В. Титок,
И. П. Шейко, Р. И. Шейко — члены редколлегии;
Е. М. Селихова — ответственный секретарь.

УДК [577.21+575] (082)

ISSN 1999-9127

СОДЕРЖАНИЕ

О. Г. Бабак, Е. В. Дрозд, Н. А. Некрашевич, Н. В. Анисимова, К. К. Яцевич, А. В. Кильчевский Разработка молекулярных маркеров накопления антоцианов в плодах и изучение особенностей взаимодействия генов <i>Ant1</i> , <i>An2</i> и <i>Atv</i> у <i>Solanum lycopersicum</i>	7
О. А. Орловская, Л. В. Хотылёва, А. В. Кильчевский Влияние интрогрессии чужеродного генетического материала на основные показатели качества зерна мягкой пшеницы	24
Л. В. Можаровская, С. В. Пантелеев, О. Ю. Баранов Гены терпенсинтаз (<i>TPS</i>) <i>Pinus Sylvestris</i> L.: идентификация и структурно-функциональная аннотация на основе анализа транскриптомных данных	35
А. Н. Заинчковская, Е. А. Фомина, О. Ю. Урбанович Изучение уровня экспрессии генов <i>HvGT-8</i> , <i>HvGT-10</i> и <i>HvGT-42</i> у сортов озимого ячменя в моделируемых условиях холодостресса	43
Е. В. Лагуновская Микросателлитные маркеры, ассоциированные с параметрами андрогенеза <i>in vitro</i> , у тритикале (\times <i>Triticosecale</i> Wittm.) и пшеницы (<i>Triticum aestivum</i>)	52
Е. М. Кулик, Т. Н. Камедько, Р. М. Пугачёв Молекулярно-генетический анализ сортов земляники садовой по генам аромата плодов <i>FaOMT</i> и <i>FaFAD1</i>	65
А. Н. Верчук, А. В. Кильчевский Тестирование коммерческих наборов и методов выделения ДНК для молекулярно-генетических исследований пыльцы растений	71
О. Э. Соловей, Е. Э. Хейдорова, К. В. Гомель, М. Е. Никифоров Филогеографическое положение белорусской популяции евразийского бобра <i>Castor fiber</i> L. как отражение ее происхождения	82
А. А. Ланевич, Р. С. Шулинский, Ю. В. Бондаренко, Н. В. Воронова-Барте Характеристика генов семейства ABC-транспортеров, участвующих в процессе детоксикации ксенобиотиков, в геноме тли <i>Aphis craccivora</i> Koch, 1854	91
В. О. Молчан, Е. Г. Скуратович, О. Э. Соловей, И. С. Юрченко, Д. О. Шатило, Г. В. Сергеев, К. В. Гомель, Е. Э. Хейдорова, М. Е. Никифоров Генетическое разнообразие популяций щуки обыкновенной (<i>Esox lucius</i>) и окуня речного (<i>Perca fluviatilis</i>), обитающих в условиях радиоактивного загрязнения и на интактных территориях	101
В. Н. Кипень, Е. В. Снытков, М. Е. Михайлова, Р. И. Шейко Дифференциация пород свиней с использованием технологии KASP — тест-система для породы дюрок	114

<i>О. М. Малышева, Е. П. Михаленко, О. Ч. Мазур, А. В. Кильчевский</i> Вариабельность генов, ассоциированных с бронхолегочной дисплазией и ретинопатией у недоношенных новорожденных	123
<i>А. В. Горбач, Е. П. Михаленко, О. Ч. Мазур, Л. И. Кастюкевич, О. Н. Романова, К. Ю. Мараховский, О. Н. Назаренко, А. В. Кильчевский</i> Разнообразие патогенных таксонов микробиома у детей с воспалительными заболеваниями кишечника	135
<i>Д. А. Кучерявая, М. Д. Амелянович, В. Д. Румянцева, Т. О. Сухан, И. И. Саванович, А. В. Чуприна, О. Е. Полулях, Т. Б. Мелик-Касумов, П. М. Морозик</i> Анализ ассоциации полиморфных вариантов генов метаболизма витаминов со статусом витамина D у спортсменов	149
<i>Н. В. Волкова, Е. А. Аксёнова, А. А. Яцкив, Н. В. Никитченко, А. В. Солнцева, Р. И. Гончарова</i> Влияние полиморфизмов генов <i>CTLA-4</i> и <i>RTPN22</i> у детей с сахарным диабетом 1-го типа на предрасположенность к аутоиммунным заболеваниям щитовидной железы	159

CONTENTS

<i>O. G. Babak, E. V. Drozd, N. A. Nekrashevich, N. V. Anisimova, K. K. Yatsevich, A. V. Kilchevsky</i> Development of molecular markers for the accumulation of anthocyanins in fruits and studying the specifics of <i>Ant1</i> , <i>An2</i> and <i>Atv</i> gene interaction in <i>Solanum lycopersicum</i>	7
<i>O. A. Orlovskaya, L. V. Khotyleva, A. V. Kilchevsky</i> Effect of foreign genetic material introgression on the main grain quality indices of common wheat	24
<i>L. V. Mozharovskaya, S. V. Panteleev, O. Yu. Baranov</i> <i>Pinus Sylvestris</i> L. terpene synthase (<i>TPS</i>) genes: identification, structural and functional annotation based on the transcriptomic data analysis.....	35
<i>A. N. Zainchkovskaya, A. A. Famina, O. Yu. Urbanovich</i> Study of the expression level of the <i>HvGT-8</i> , <i>HvGT-10</i> and <i>HvGT-42</i> genes in winter barley varieties under simulated cold stress conditions.....	43
<i>E. V. Lagunovskaya</i> Microsatellite markers associated with <i>in vitro</i> androgenesis parameters in triticale (<i>× Triticosecale</i> Wittm.) and wheat (<i>Triticum aestivum</i>).....	52
<i>E. M. Kulik, T. N. Kamedzko, R. M. Pugachev</i> Molecular genetic analysis of garden strawberry varieties by <i>FaOMT</i> and <i>FaFAD1</i> fruit aroma genes	65
<i>A. N. Viarchuk, A. V. Kilchevskiy</i> Testing of commercial kits and DNA isolation methods for molecular genetic studies of plant pollen	71
<i>O. E. Solovei, E. E. Kheidorova, K. V. Homel, M. E. Nikiforov</i> Phylogeographic location of the Belarusian population of the Eurasian beaver <i>Castor fiber</i> L. as a reflection of its origin	82
<i>A. A. Lanevich, R. S. Shulinsky, Yu. V. Bondarenko, N. V. Voronova-Barte</i> Characteristics of ABC transporter genes involved in the process of xenobiotics detoxification in the <i>Aphis craccivora</i> Koch genome, 1854	91
<i>V. O. Molchan, E. G. Skuratovich, O. E. Solovei, I. S. Yurchenko, D. O. Shatilo, G. V. Sergeev, K. V. Homel, E. E. Kheidorova, M. E. Nikiforov</i> Genetic diversity of northern pike (<i>Esox lucius</i>) and European perch (<i>Perca fluviatilis</i>) populations living under the conditions of radioactive contamination and in intact territories ...	101
<i>V. N. Kipen, E. V. Snytkov, M. E. Mikhailova, R. I. Sheyko</i> Differentiation of pig breeds using KASP technology — test-system for Duroc	114
<i>V. M. Malyshava, A. P. Mikhalenka, A. Ch. Mazur, A. V. Kilchevsky</i> Variability of genes associated with bronchopulmonary dysplasia and retinopathy in premature newborns	123

- A. V. Gorbach, E. P. Mikhaleuka, O. Ch. Mazur, L. I. Kastukevich, O. N. Romanova, K. Y. Marakhovsky, O. N. Nazarenko, A. V. Kilchevsky*
Diversity of pathogenic microbiome taxa in children with inflammatory bowel disease 135
- D. A. Kucheryavaya, M. D. Ameliyanovich, V. D. Rummyantseva, T. O. Suhan, I. I. Savanovich, A. V. Chuprina, O. E. Polulyah, T. B. Melik-Kasumov, P. M. Marozik*
Analysis of the association of the polymorphic variants of vitamins metabolism genes with vitamin D status in athletes 149
- N. V. Volkova, E. A. Aksenova, H. A. Yatskiu, N. V. Nikitchenko, A. V. Solntseva, R. I. Goncharova*
Effect of *CTLA-4* and *PTPN22* gene polymorphisms on a predisposition to autoimmune thyroid diseases in children with type 1 diabetes mellitus 159

О. Г. Бабак, Е. В. Дрозд, Н. А. Некрашевич, Н. В. Анисимова, К. К. Яцевич, А. В. Кильчевский

РАЗРАБОТКА МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАРКЕРОВ НАКОПЛЕНИЯ АНТОЦИАНОВ В ПЛОДАХ И ИЗУЧЕНИЕ ОСОБЕННОСТЕЙ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ГЕНОВ *ANT1*, *AN2* И *ATV* У *SOLANUM LYCOPERSICUM*

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

Выполнено ресеквенирование генов *Ant1*, *An2* и *Atv* MYB TF на коллекции образцов *S. lycopersicum* и близких диких видов томата с различным накоплением антоцианов в плодах. Разработаны новые молекулярные маркеры для ДНК-типирования аллелей генов *Ant1* (SCAR Ant1.1-FAM), *An2* (SCAR An2-AFT (OM), SCAR An2-4F/R), *Atv* (SCAR Atv2), подтверждена их высокая эффективность. Показано тесное сцепление аллелей *Ant1* и *An2-Aft*, *ant1* и *Myb75* генов *Ant1* и *An2*. Обнаружен новый аллель гена *An2* у *S. glandulosum* (*An2-Ins57*), отличительные полиморфизмы которого от *Myb75* ведут к шести аминокислотным заменам в белковой последовательности, две из них расположены в области первого и второго ДНК-связывающих доменов. Выявлено максимальное накопление антоцианов в вегетативных органах и плодах у образцов с аллелями *Ant1/An2-Aft/atv* в генотипе. Сочетание аллелей *ant1/Myb75/Atv* связано с отсутствием антоцианов в различных частях растения. Комбинация аллелей *Ant1/An2-Aft/Atv* обеспечивает слабое накопление антоцианов в вегетативных органах, но высокое их накопление в коже плодов.

Ключевые слова: *Solanum lycopersicum*, полиморфизм генов *Ant1*, *An2* и *Atv*, регуляция синтеза антоцианов, ДНК маркеры.

Введение

Несмотря на относительный успех, достигнутый в увеличении содержания антоцианов в плодах томатов с помощью трансгенеза [1], потребность современного мирового общества в продуктах для здорового питания обеспечивает интерес к созданию сортов с высоким содержанием антоцианов, полученных без использования методов генной инженерии. В связи с этим изучение вопросов генетической регуляции биосинтеза антоцианов в плодах и поиск новых источников повышения их концентрации является актуальной задачей.

Sapir M. с соавторами [2], изучая *Anthocyaninfruit* (*Aft*) фенотипы томата с пурпурным цветом кожицы и наружного слоя околоплодника, установили, что доминантный аллель гена *Anthocyanin1* (*Ant1*) из *S. chilense* увеличивает количество флавоноидов в плодах томатов. Они показали, что наряду с антоцианами *Aft*-фенотипы *S. chilense* характеризуются значительно более высоки-

ми уровнями флавонолов кверцетина и кемпферола, что повышает их функциональную ценность. Авторы указывали на полную ассоциацию *Aft* фенотипа с геном *Ant1*, кодирующим Myb фактор транскрипции и его отличия по нуклеотидному и аминокислотному составу у *S. chilense* и *S. lycopersicum* [1]. Изучение генетики близкородственных диких видов позволило выделить и интрогрессировать источники повышения концентрации антоцианов в плодах *S. lycopersicum*. Интрогрессия доминантного аллеля *Ant1* из *Solanum chilense* в сорта окультуренного томата привела к незначительному светозависимому накоплению антоцианов в коже плодов [3–6]. Наряду с геном *Anthocyanin1* (*Ant1*), *Aft*-фенотип связан с полиморфизмом генов MYB TF *An2* (локус NC_015447, хромосома 10), *AN2-like* (локус OP094092.1, хромосома 10), *ATV* (локус NC_015444, хромосома 7) [7]. В связи с недостаточной изученностью аллельного полиморфизма указанных генов в литературе

чаще говорится о генах, связанных с фенотипом Aft, чем указываются конкретные сочетания аллелей [3–6].

Известно, что рецессивный аллель гена *atroviolacea* (*atv*) из *Solanum cheesmaniae* в сортах культурного томата приводил к накоплению антоциана в вегетативных органах и плодах [8]. Х. Сао с соавторами [8] показали, что добавление аллеля *atv* к Aft комплексу генов приводило к резкому увеличению пигментации антоцианов в коже плодов, особенно в стрессовых условиях (избыточный солнечный свет, пониженные температуры), что указывает на то, что ген *Aft* взаимодействует с геном *atv* в регуляции биосинтеза антоцианов.

В ранее выполненных исследованиях на основе данных по полиморфизму гена *Ant1* [2] нами апробированы SCAR маркер *Ant1_NcoI*, позволяющий дифференцировать формы томата по наличию в генотипе аллелей *ant1* или *Ant1*, и SCAR маркер *Atv-Ins*, позволяющий выявлять в генотипах аллели *atv* или *Atv* [8]. ДНК-маркирование известных аллелей и фенотипическая оценка широкой коллекции форм томата по признаку накопления антоцианов в вегетативных органах и плодах не смогла объяснить всех имеющихся фенотипов, связанных с накоплением антоцианов в плодах. На основе информации из базы данных NCBI были обнаружены последовательности двух аллелей гена *An2*: *An2-Aft*, *Myb75*. В связи с чем целью нашей работы был поиск новых полиморфизмов генов *Anthocyanin1* (*Ant1*), *Anthocyanin2* (*An2*), *Atroviolacea* (*Atv*), изучение их взаимодействия для использования в селекции, направленной на улучшение качества плодов томата. Для этого были поставлены следующие задачи: оценить наблюдаемое фенотипическое проявление признака «накопление антоцианов в вегетативных органах и плодах томата» на разных стадиях развития

растений; выявить полиморфизм изучаемых генов *Ant1*, *An2* и *Atv* путем ресеквенирования у форм *Solanum lycopersicum* и диких видов (подвидов) томата с различным накоплением антоцианов в вегетативных органах и плодах; подобрать ДНК-маркеры для типирования выявленных полиморфизмов и оценить возможность маркирования новых фенотипических проявлений накопления антоцианов на основе выявленных структурных изменений последовательностей изучаемых генов.

Материалы и методы

Объектами для исследований полиморфизма генов *Ant1*, *An2* и *Atv* являлись константные формы с различным характером накопления антоцианов в плодах и вегетативных органах (рис. 1, 2).

Образцы Дачный и Линия № 17-2020 характеризуются отсутствием накопления антоцианов в плодах, формы Индиго, Дзивосны и Октябрюта имеют повышенное накопление антоцианов в коже плодов с максимальным проявлением у образца Октябрюта, которое приводит к практически черной окраске плода на стадии технической спелости. Особенностью формы Бурштын является неравномерное распределение антоциана по поверхности плода с образованием так называемого янтарного рисунка. Форма Белесый ИСИ на стадии технической спелости характеризуется отсутствием накопления антоцианов, а также низким накоплением хлорофилла в вегетативных органах и плодах, образец Blue leaf характеризуется высоким накоплением антоцианов в вегетативных органах и их отсутствием в плодах (рис. 1, 2).

Наряду с образцами *S. lycopersicum* для исследований были использованы восемь родственных диких форм: *S. pimpinellifolium*, *S. humboldtii*, *S. glandulosum*, *S. peruvianum*,



Рис. 1. Формы с различным фенотипическим проявлением признака «накопление антоцианов в плодах на стадии технической и биологической спелости»: А — Дачный; Б — Линия № 17-2020; В — Индиго; Г — Дзивосны; Д — Октябрюта; Е — Бурштын; Ж — Белесый ИСИ

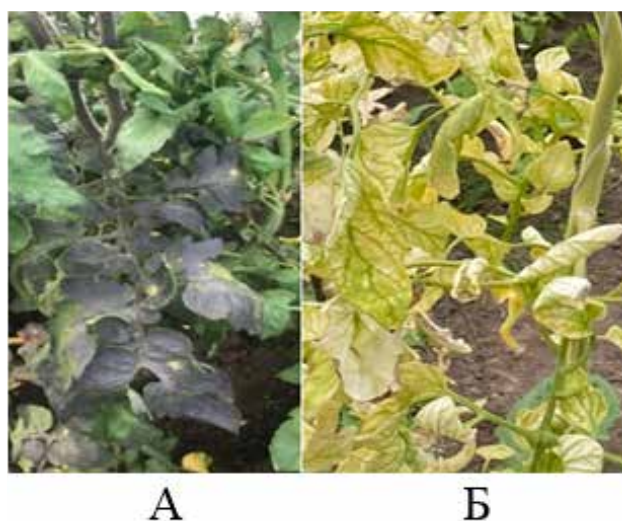


Рис. 2. Формы с различным накоплением антоцианов в вегетативных органах: А — Blue leaf; Б — Белесый ИСИ

S. chilense, *S. cheesmanii*, *S. paviflorum*, *S. hirsutum*.

Для изучения связи выявленных полиморфизмов генов *Ant1*, *An2* и *Atv* с фенотипом, а также для оценки эффективности разработанных ДНК-маркеров использовались популяции F_2 с различным составом аллелей гена *Anthocyanin1* (*Ant1*): 157 индивидуальных растений гибрида Индиго (*Ant1*) × Дачный (*ant1*), 79 растений гибрида Индиго (*Ant1*) × № 17-2020 (*ant1*), а также 370 растений популяций F_3 из указанных гибридов.

Выделение ДНК проводили при помощи набора реагентов компании Праймтех из молодых верхушечных листьев растений томата согласно протоколу производителя. Концентрацию ДНК в образце определяли на спектрофотометре Ultrospec 3300 pro.

Секвенирование последовательностей *Ant1*, *An2* и *Atv* проводили с подобранными геноспецифическими праймерами на основе последовательности участка хромосомы 10 томата (EF433416.1), где локализован ген

Ant1, хромосомы 10 томата (NC_015447.3), где локализован ген *An2*, хромосомы 7 томата (NC_015444.3), где локализован ген *Atv* (табл. 1). Использовали набор реагентов Big Dye® Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Kit согласно методике производителя. Для дизайна праймеров использовали программу Primer-BLAST на сайте Центра биотехнологической информации NCBI [7].

Продукты секвенирующей реакции очищали спиртовым осаждением и растворяли в 20 мкл формамида, денатурировали нагреванием до 95 °C в течение 2 мин и далее проводили капиллярный электрофорез с использованием ДНК-секвенатора Genetic Analyzer 3500. Компьютерную обработку данных, полученных в результате секвенирования, проводили в программе Sequencing Analysis Software v 5.2.

Для построения аминокислотных последовательностей использовали программу Blast на сайте Центра биотехнологической информации NCBI [7].

ДНК-типирование материала с разработанными маркерами проводили согласно разработанным протоколам ДНК-идентификации аллелей изучаемых генов [9].

Эффективность разработанных маркеров оценивали по соответствию между наблюдаемым фенотипическим и ожидаемым по результатам ДНК-типирования расщеплениям изучаемых признаков методом Хи-квадрат (χ^2), где общей мерой отклонения практических данных от теоретических, т. е. критерия соответствия χ^2 , является сумма отношений квадратов разностей между частотами практического f_n и теоретического F_n распределений к частотам теоретического F_n распределения для данной выборки (формула 1) [10].

$$\chi^2 = \sum ((f_n - F_n)^2) / F_n \quad (1)$$

Таблица 1

Праймеры для секвенирования генов *Ant1*, *An2*, *Atv* у томата

Ген, белок	Наименование праймера	Последовательность праймера, 5' → 3'	Т отжига, °C	Размер ПЦР продукта, п. п.
<i>ANT1</i> , R2R3MYB TF	An1-1F/R	CTCTCTACAAGTTGGTAGTTACAA	56	678
		CACACTTATTGTTAATCTTTTCGCGA		
	An1-2F/R	ATGCAAGTTTATGTTTTGACAAA	50	754
		CATTCTAACAACATTAATTACTTC		

Окончание таблицы 1

Ген, белок	Наименование праймера	Последовательность праймера, 5' → 3'	T отжига, °C	Размер ПЦР продукта, н. п.
MYB75 (AN2), R2R3MYB TF	An2-1F/R	CACCATGAATACTCCTATGTGTGC	59	792
		AGACAAACCGTGCTAGTCTCATT		
	An2-2F/R	TТАААСААТСАТСГТТГТСТГАТ	54	928
		TТААТТААГТАГАТТССАТААГТСААТАТС		
	An2-1.1F/R	АТТАСААГТГТСАТТТТГТГГАААГ	51	370
		ТСААААСТТАГААТТТАГТАААТС		
	An2-4F/R	АСТТСАСАААСТСТТАГГСААТАГ	56	580
		АГТСТАССАГСААТААГТГАССАС		
	An2-3.1F/R	АСТГГААААТТГСАТТГАААТТГ	51	352
		АТАТТСТТТААТАССААСТАААГГАТ		
An2-1AFTF	GGCATCTTGTTCCTGCTAGAGCTG	61	907	
	GTCTACCAGCAATAAGTGACCACC			
An2-2AFTF	TCCAGATGAAGTGGATCTCACTT	59	1 056	
	ACGGTGGTGATATTCCTCATGTAAC			
ATV, R3MYB TF	Atv1F/R	CAGTCGATATTTGAGTATCCACC	52	728
		GTATTTTGAAGTAGCCAAAAGG		
	Atv2F/R	СТААТГАГСТААГГГТАААСАТГ	52	795
		ТТАТГААГТАСАТСГААТТААТАТТАГ		
	Atv3F/R	TTTTGTGATTAATTAATTAAGGTTT	50	586
		АТГТАТТСГСГСТТГТАТТАТТГ		
	Atv4F/R	ТТАТСТААСТТАТСТАСТГТАГАТТАТ	52	461
		ГАТАТТСАСТГТГТАСТАСТГТТС		
	Atv5F/R	ТАТТСГТТААГГТААГАТАСААТА	50	477
		АТТГАТАТСТАГТГААТААСТАТТ		
	Atv6F/R	САТТААСТТТАТТТТААСТТТАТСТАСТТТ	52	608
		ААТАГТТГААГГССААТАТСТАТГА		
	Atv7F/R	САТТАТСТАТТАААСТТТТТАТТААГГ	52	712
		ТАААСААТТГТГТСГТСАААСАС		

Результаты исследования

Секвенирование гена *Anthocyanin1* (EF433416.1) проводилось на коллекции образцов томата Бурштын, Дзивосны, Дачный, Индиго, фенотипическое описание которых представлено в разделе «Материалы и методы» и на рисунке 1. Данная коллекция использована, чтобы выяснить, связаны ли описанные особенности накопления антоцианов с полиморфизмом данного гена. В результате ресеквенирования гена *Ant1* у четырех коллекционных образцов было обнаружено два аллеля гена *Ant1*. Из проанализированных образцов сорт Дачный характеризуется нали-

чием аллеля *ant1*, описанного в базе данных (EF433416.1), а сорта Дзивосны, Индиго и Бурштын — аллеля *Ant1*. У аллеля *ant1* у сорта Дачный с наименьшим накоплением антоцианов в плодах выявлены следующие отличия от аллеля *Ant1*: 12 SNP в экзонных и 10 интронных областях, инсерция 4 н. п. в интроне 1, что соответствует найденной последовательности аллеля *ant1* (EF433416.1) (рис. 3).

Белковые последовательности с указанием аннотированных регуляторных элементов TF, формируемые на базе двух аллелей *Ant1* и *ant1* (рис. 4), различаются между собой наличием восьми аминокислотных замен за пределами

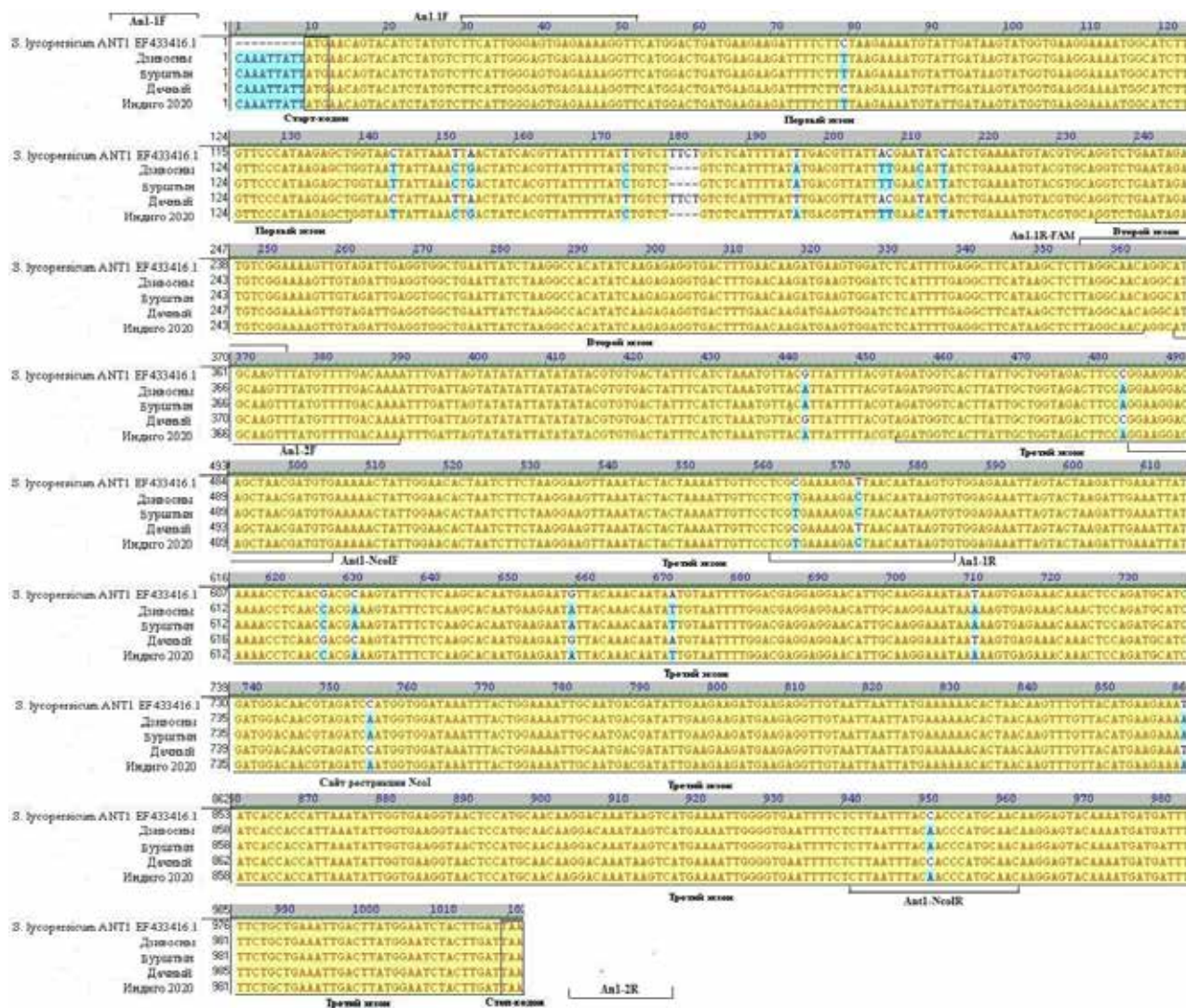


Рис. 3. Выравнивание нуклеотидных последовательностей гена *AntI*

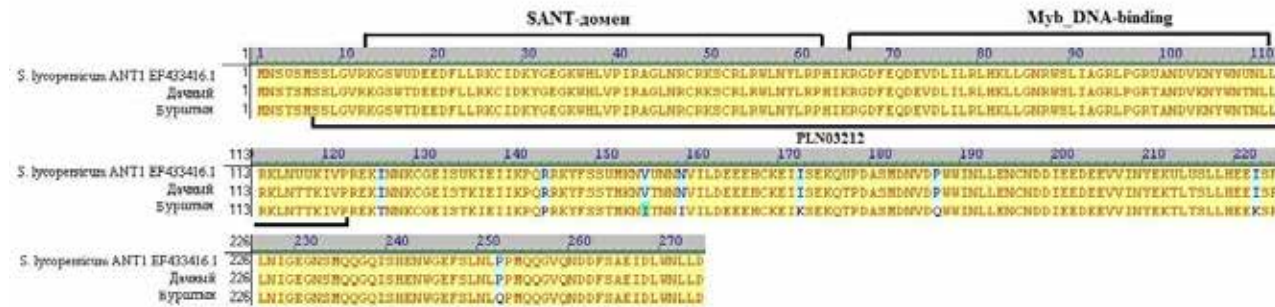


Рис. 4. Аминокислотные последовательности ANTI TF и их регуляторные элементы, синтезируемые на основе аллелей *AntI* и *antI*

известных ДНК-связывающих доменов.

Учитывая, что области известных доменов, особенно ДНК-связывающего домена, у данных двух аллелей одинаковы, можно предположить, что существует еще неизученная

область связывания с ДНК или данный ген не участвует в регуляции экспрессии структурных генов биосинтеза антоцианов.

Несмотря на различный характер накопления антоцианов в плодах сортов Дзюновский

Индиго и Бурштын, полиморфизма по экзонно-интронной части гена *Ant1* у них не обнаружено, что говорит об отсутствии связи данного гена с характером распределения антоциана по поверхности плода.

Ранее для типирования аллелей гена *Ant1* нами был апробирован CAPS маркер Ant1-NcoI (F: GGAAGGACAGCTAACGATGTG, R: GTTGCATGGGTGGTAAATTAAG) к сайту рестрикции в третьем экзоне аллеля *ant1*, возникшему в результате SNP (A/C) в положении +756 (рис. 1), приводящей к аминокислотной замене (Q-P) (рис. 2, номер аминокислоты 187) [2].

На основе выявленных полиморфизмов при ресеквенировании гена *Ant1* для исключения этапа рестрикции при идентификации аллелей *ant1* и *Ant1* была выделена маркируемая область, включающая инсерцию в первом интроне размером 4 п. н. Подобрана следующая пара праймеров с флюоресцентной меткой [9]: An1.1 (FAM)F: TTCATTGGGAGTGAGAAAAGGTT; An1.1R: AACTTGCATGCCTGTTGCCTA.

В результате апробации праймеров были получены фрагменты 340 п. н. у аллеля *Ant1* и 344 п. н. — у аллеля *ant1*.

Для проверки эффективности работы нового маркера выполнен анализ расщепляющихся популяций F₂ с различным составом аллелей генов *Anthocyanin1* (*Ant1*): Индиго (*Ant1*) × Дачный (*ant1*) и Индиго

(*Ant1*) × № 17-2020 (*ant1*) с использованием двух маркеров. Частичные результаты представлены в таблице 2. Согласно полученным данным, результаты типирования аллелей полностью совпадают, что говорит об эффективности использования нового маркера.

Таким образом, ресиквенс гена *Ant1* подтвердил наличие двух аллелей у изучаемых форм томата, а также позволил разработать новый молекулярный маркер для их разделения на основе делеции в интронной области в последовательности аллеля *Ant1*. Новый маркер позволяет эффективно разделить аллели *Ant1* и *ant1* гена *Ant1* в случае отсутствия рестриктазы, однако требует анализа фрагментов ПЦР в полиакриламидном геле.

Для ресеквенирования гена *An2* *S. lycopersicum* были взяты формы с различным характером накопления антоцианов в вегетативных и генеративных частях растений: в качестве сортов без накопления антоцианов в плодах и вегетативных органах использованы образцы ИСИ 63, Золотце, а также указанные выше образцы (рис. 1, 2). Поскольку из литературных источников известно, что ген *Ant1* интрогрессирован из *S. chilense*, для ресеквенирования гена *An2* были взяты дикие родственные формы. С помощью разработанных праймеров (табл. 1) была проведена амплификация, выполнено секвенирование и выравнивание полученных фрагментов (рис. 5А и 5Б).

Таблица 2

Результаты ДНК-типирования аллелей гена *Ant1* с использованием CAPS Ant1-NcoI, SCAR An1.1 (FAM) маркеров

Номер образца по номенклатуре 2022 г.	CAPS маркер Ant1-NcoI	SCAR маркер An1.1 (FAM)
	Размеры иаркируемых продуктов, п. н.	
100-6	478	340
100-9	478	340
100-15	478, 271, 207	340, 344
100-17	271, 207	344
100-21	478	340
100-40	271, 207	344
100-42	271, 207	344
100-51	478	340
100-61	478, 271, 207	340, 344
100-71	478, 271, 207	340, 344

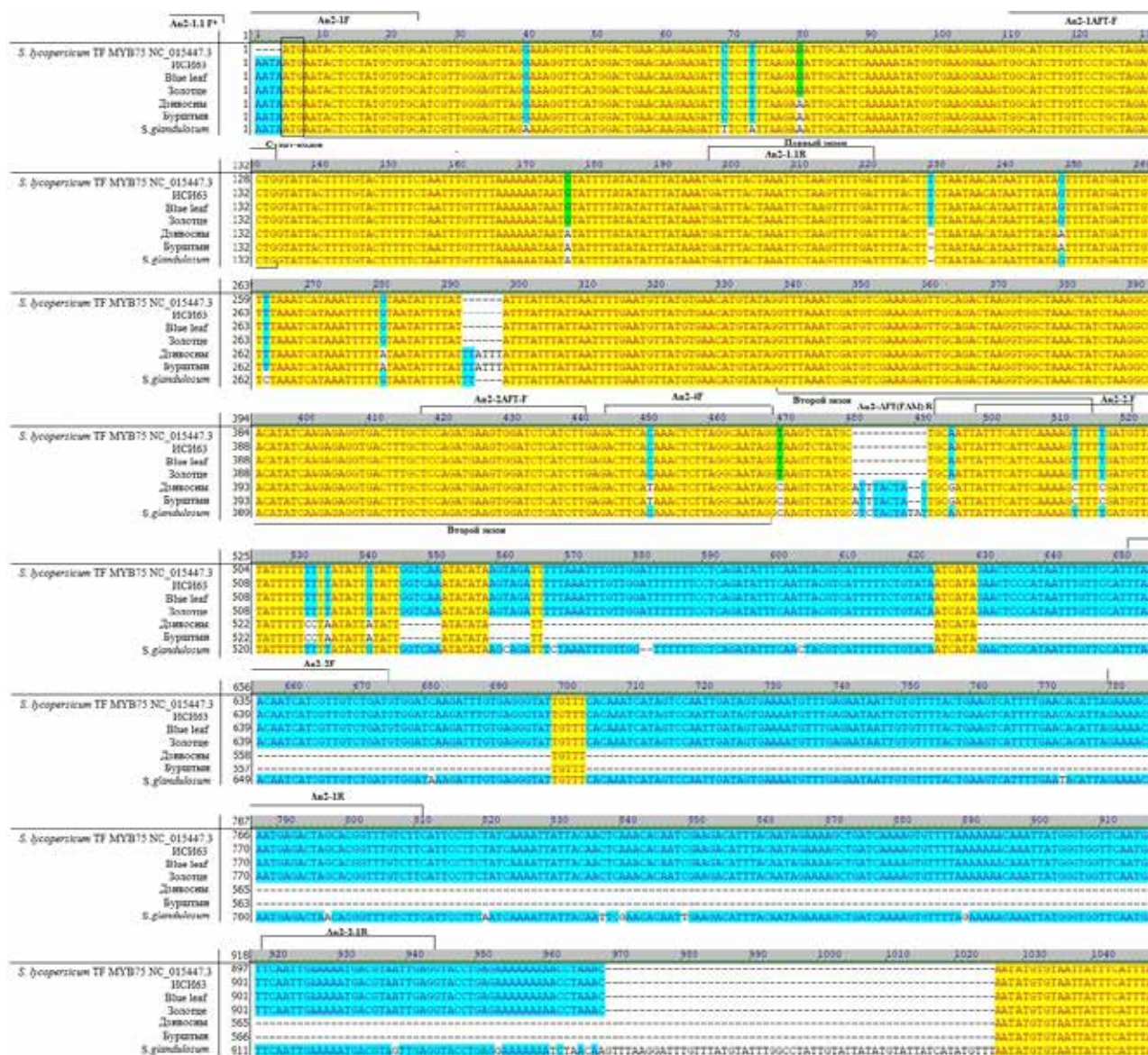


Рис. 5А. Выравнивание нуклеотидных последовательностей гена *An2*

В результате ресеквенирования гена *An2* установлено полное соответствие структуры аллелей гена известным последовательностям: *Myb75* у образцов ИСИ 63, Золотце, Blue leaf и *An2-Aft* — у форм Дзівосны, Бурштын. Полученные результаты показывают отсутствие связи между характером распределения антоцианов у форм Дзівосны и Бурштын и аллельным составом гена *An2*. Основными отличиями аллеля *An2-Aft* от *Myb-75* являются 14 SNP в экзонных областях. Из них 1 SNP замена расположена в первом экзоне, 1 SNP — во втором экзоне, 6 SNP — в третьем экзоне до стоп-кодона и 6 SNP — после стоп-кодона. Кроме полиморфизмов в экзон-

ной области, у изучаемых двух аллелей выявлены существенные различия в интронных областях: две вставки, содержащие TTA-боксы в первом и втором интронах общим размером 14 п. н., три делеции общим размером 410 п. н. во втором интроне аллеля *An2-Aft* (рис. 5А и 5Б).

В результате ресеквенирования гена *An2* у родственной дикой формы *S. glandulosum* был выявлен аллель гена *An2*, ранее незарегистрированный в базе данных NCBI. Основными отличиями аллеля, названного нами *An2-Ins57*, от *Myb75* у данного дикого вида являются: 13 SNP в экзонных областях. Из них 4 SNP расположены в первом экзоне,



Рис. 5Б. Выравнивание нуклеотидных последовательностей гена *An2*

6 SNP — в третьем экзоне до стоп-кодона и 3 SNP — после стоп-кодона. Кроме полиморфизмов в экзонной области, у изучаемых двух аллелей выявлены различия в интронных областях: делеция размером 1 п. н. и вставка 2 п. н. в первом интроне, делеция 2 п. н. и три вставки общим размером 69 п. н. в интроне 2 у аллеля *An2-Ins57 S. glandulosum* (рис. 5А и 5Б).

На рисунке 6 представлены белковые последовательности, формируемые на базе трех аллелей *An2*, с указанием аннотированных регуляторных элементов ТФ. Анализ последовательностей выявил одну общую аминокислотную замену в области SANT-домена (D→N, аспарагиновая кислота — аспарагин),

формируемую на базе аллелей *An2-Aft* и *An2-Ins57*, отличную от последовательности, формируемой аллелем *Myb75*. В целом аминокислотные последовательности аллелей *An2-Aft* и *An2-Ins57* отличаются от последовательности аллеля *Myb-75* шестью различными заменами.

На основе выявленных полиморфизмов аллелей *An2-Aft*, *Myb75* и *An2-Ins57* были подобраны праймеры, представленные в таблице 3, а также разработаны два протокола ДНК-типирования аллелей [9].

SCAR *An2-AFT*(OM) маркер с флуоресцентной оптической меткой охватывает область SNP замены в первом экзоне, изменяющей

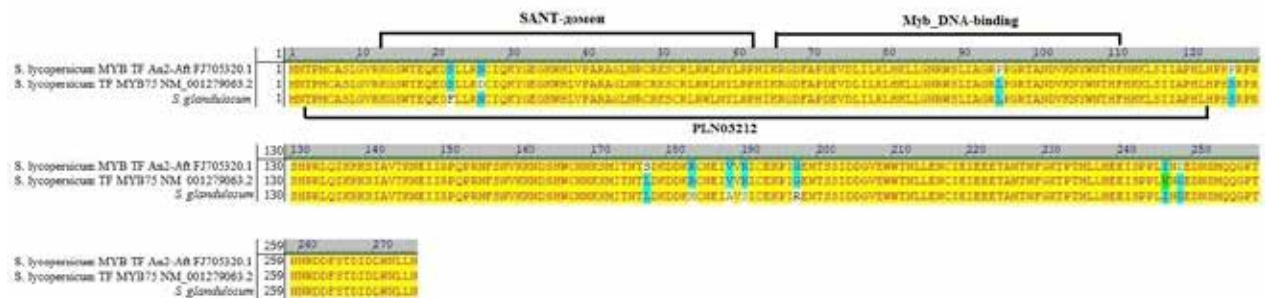


Рис. 6. Аминокислотные последовательности AN2 ТФ и их регуляторные элементы, синтезируемые на основе аллелей *An2*, *An2-Aft* и *An2-Ins57*

Таблица 3

Праймеры для выявления аллелей гена *An2 Solanum lycopersicum*

Ген, белок	Полиморфизм	Последовательность 5'-3'	Т отжига, °С
<i>MYB75 (AN2), R2R3MYB TF</i>	Инсерции и делеция в первом и втором интроне общим размером 14 п. н.	An2-AFT(FAM) F: ATTACAAGTGTCATTTTGTGGAAAG An2-AFT R: AAАСТТТТGAATGAAATAATTGC	51
	Инсерции размером 9 п. н. и три делеции общим размером более 410 п. н. во втором интроне	An2-4F: АСТТCACAААСТСТTAGGCAATAG An2-4R: AGTCTACCAGCAATAAGTGACCAC	61

аминокислотный состав белка в области первого ДНК-связывающего домена, и инсерций в 1 и 2 интроне, содержащих ТТА-боксы, размером 6 и 9 п. н. Размер продукта амплификации с подобранными праймерами составляет 647 п. н. для *Myb75* аллеля, 661 п. н. для *An2-Aft* аллеля и 659 п. н. для *An2-Ins57* аллеля, что четко разделяется на генетическом анализаторе в полиакриламидном геле.

С целью упрощения методики выявления аллелей гена *An2* разработан SCAR маркер An2-4, охватывающий области крупных делеций во втором интроне. После амплификации и последующей разгонки в агарозном геле у растений с аллелем *Myb75* образуется фрагмент размером 580 п. н., с аллелем *An2-Aft* — 186 п. н., с аллелем *An2-Ins57* — 647 п. н. (рис. 7).

Таким образом, ресиквенс гена *An2* показал наличие трех аллелей у изучаемых форм томата, а также позволил разработать новые молекулярные маркеры для их разделения.

Изучение связи между особенностями накопления антоцианов в растениях и полиморфизмом гена *Atroviolacea* было начато с апробации известного в литературе SCAR маркера ATV-In(FAM) для выявления двух аллелей *Atv* и *atv* (табл. 4) [8]. При типировании широкой

коллекции образцы Ту-42 и Ту-48 показали наличие фрагментов нетипичных размеров, что дало основание включить их в число форм для секвенирования, наряду с формами Blue leaf, Бурштын, Белесый ИСИ, Октябрята (рис. 2).

В результате ресеквенирования гена *Atv* (рис. 8А, 8Б) указанной коллекции образцов установлено полное соответствие структуры аллелей гена известным последовательностям *Atv* у образцов Бурштын, Белесый ИСИ и *atv* у образцов Blue leaf, Октябрята (рис. 8А, 8Б). Основными отличиями аллеля *atv* от *Atv* являются 6 SNP в экзонных областях (из них 1 SNP расположена в третьем экзоне, 2 SNP — в четвертом экзоне до стоп-кодона и 3 SNP — после стоп-кодона), а также вставка размером 4 п. н. во втором экзоне, приводящая к сдвигу рамки считывания ДНК, образованию раннего стоп-кодона и синтезу нефункционального белка. Выявлено, что аллель *atv* обеспечивает повышенное накопление антоцианов в вегетативных частях у образца Blue leaf (при отсутствии аллелей *Ant1* и *An2-Aft*) и усиление накопления антоцианов в плодах у образца Октябрята (при наличии в генотипе аллелей *Ant1* и *An2-Aft*). Отсутствие индивидуальных полиморфизмов у форм Бурштын, Белесый ИСИ указывает, что особенности накопления и распределения пигментов у данных форм не связаны с геном *Atv*. Кроме полиморфизмов в экзонной области у изучаемых двух аллелей выявлены различия в интронных областях: одна однонуклеотидная делеция и 7 SNP в первом интроне, делеции размером 1 п. н. и 2 п. н., 13 SNP и три вставки общим размером более 390 п. н. в третьем интроне у аллеля *atv*.

У образцов Ту-42 и Ту-48 был выявлен ранее не обнаруженный в базе данных аллель, отли-

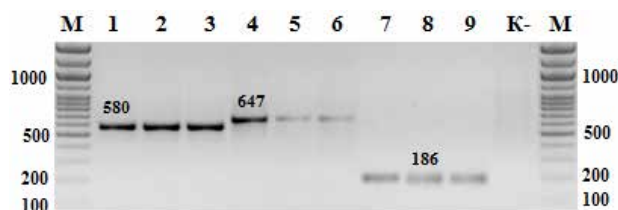


Рис. 7. Электрофореграмма ДНК-типирования образцов томата с SCAR маркером An2-4: 1–3 — *S. humboldtii*; 4–6 — *S. glandulosum*; 7–9 — *S. chilense*, К — отрицательный контроль; М — маркер молекулярного веса

Таблица 4

Праймеры для выявления аллелей гена *Atv Solanum lycopersicum*

Ген, белок	Полиморфизм	Последовательность 5'-3'	Т отжига, °С
MYB-like transcription factor ATV	Инсерция во втором экзоне размером 4 п. н.	ATV-In(FAM)F: GAGGTTTCTTCGTTGGTAGTC ATV-In R: CТAАAТAАAAGTTATTGAGTTCACG	53
	три инсерции общим размером более 390 п. н. в третьем интроне	Atv2F: GTTGGATAAGTAAGAATGTTGTAGA Atv2R: CTTCTGAAAGTACATAAACCACA	55

чиями которого от *Atv* являются 19 SNP в экзонных областях. Из них 4 SNP расположены в первом экзоне до старт-кодона, 1 SNP — во втором экзоне, 3 SNP — в четвертом экзоне до стоп-кодона и 11 SNP — после стоп-кодона. Также у аллеля, названного *Atv-Ins9*, присутствуют однонуклеотидная вставка и делеция в первом экзоне до старт-кодона и вставка размером 9 п. н. в четвертом экзоне за стоп-кодом. Кроме полиморфизмов в экзонной области, у сравниваемых двух аллелей выявлены различия в интронных областях: две однонуклеотидные вставки, вставка 2 п. н. и 5 п. н. в первом интроне, две делеции по 1 п. н. и одна размером 2 п. н. в третьем интроне, а также вставка 2 п. н. в третьем интроне, у аллеля *Atv-Ins9* (рис. 8А, 8Б).

На рисунке 9 представлены белковые последовательности, синтезируемые на базе трех аллелей *Atv*. Анализ последовательностей позволил выявить формирование на основе аллеля *atv* лишь 35 аминокислот с двумя заменами (G→R, R→T) и отсутствие ДНК-связывающего домена ТФ, что влияет на экспрессию целевых генов (рис. 9). Учитывая, что аллель *atv*, интрогрессированный из дикой формы *Solanum cheesmaniae*, связан с активным накоплением антоцианов, то можно предположить, что наличие более высокого уровня антоцианов у ряда диких форм способствовало лучшему приспособлению к биотическим и абиотическим факторам окружающей среды. Закреплению у *S. lycopersicum* аллеля *Atv*, блокирующего активный синтез антоцианов, способствовало культивирование человеком томата и оптимизация условий выращивания.

Для упрощения молекулярного разделения аллелей *atv* и *Atv* был подобран SCAR маркер *Atv2* (табл. 4) к инсерциям в третьем интроне

общим размером 392 п. н., ПЦР с подобранными праймерами дает продукты размером 460 п. н. у аллеля *Atv* и 852 п. н. — у аллеля *atv* (рис. 10). В результате апробации нового маркера на широкой коллекции форм показана идентичность результатов типирования аллелей маркерами ATV-In(FAM) и *Atv2*.

Для изучения фенотипического проявления взаимодействия аллелей генов *Ant1*, *An2* и *Atv* и подтверждения статистической достоверности эффективности разработанных маркеров проведено ДНК-типирование популяций F₂-F₃ гибридов общим количеством 606 индивидуальных растений. По результатам типирования обширной коллекции изучаемого материала была подтверждена тесная связь аллеля *An2-Aft* с аллелем *Ant1* в изучаемых образцах, которая обусловлена их сцеплением в связи с близким расположением на хромосоме 10. Расстояние между ними составляет 3 674 п. н. Частичные результаты ДНК-типирования аллелей представлены в таблице 5.

Для оценки характера накопления антоцианов на ранних стадиях развития из 370 индивидуальных растений популяций F₃ отобраны генотипы с различным гомозиготным сочетанием аллелей регуляторных генов Myb-транскрипционных факторов *Ant1*, *An2* и *Atv*: *Ant1//Ant1//An2-Aft//An2-Aft//atv/atv*, *ant1//ant1//Myb75//Myb75//atv/atv*, *Ant1//Ant1//An2-Aft//An2-Aft//Atv/Atv*, *ant1//ant1//Myb75//Myb75//Atv/Atv*. В результате анализа окраски вегетативных органов (листовой пластинки и жилок листа, стеблей) было установлено постепенное снижение накопления антоцианов от образцов с генотипом *Ant1//Ant1//An2-Aft//An2-Aft//atv/atv* с максимальной пурпурной (антоциановой) окраской к формам с сочетанием аллелей *Ant1//Ant1//An2-Aft//An2-Aft//Atv/Atv*



Рис. 8А. Выравнивание нуклеотидных последовательностей гена *Atv*

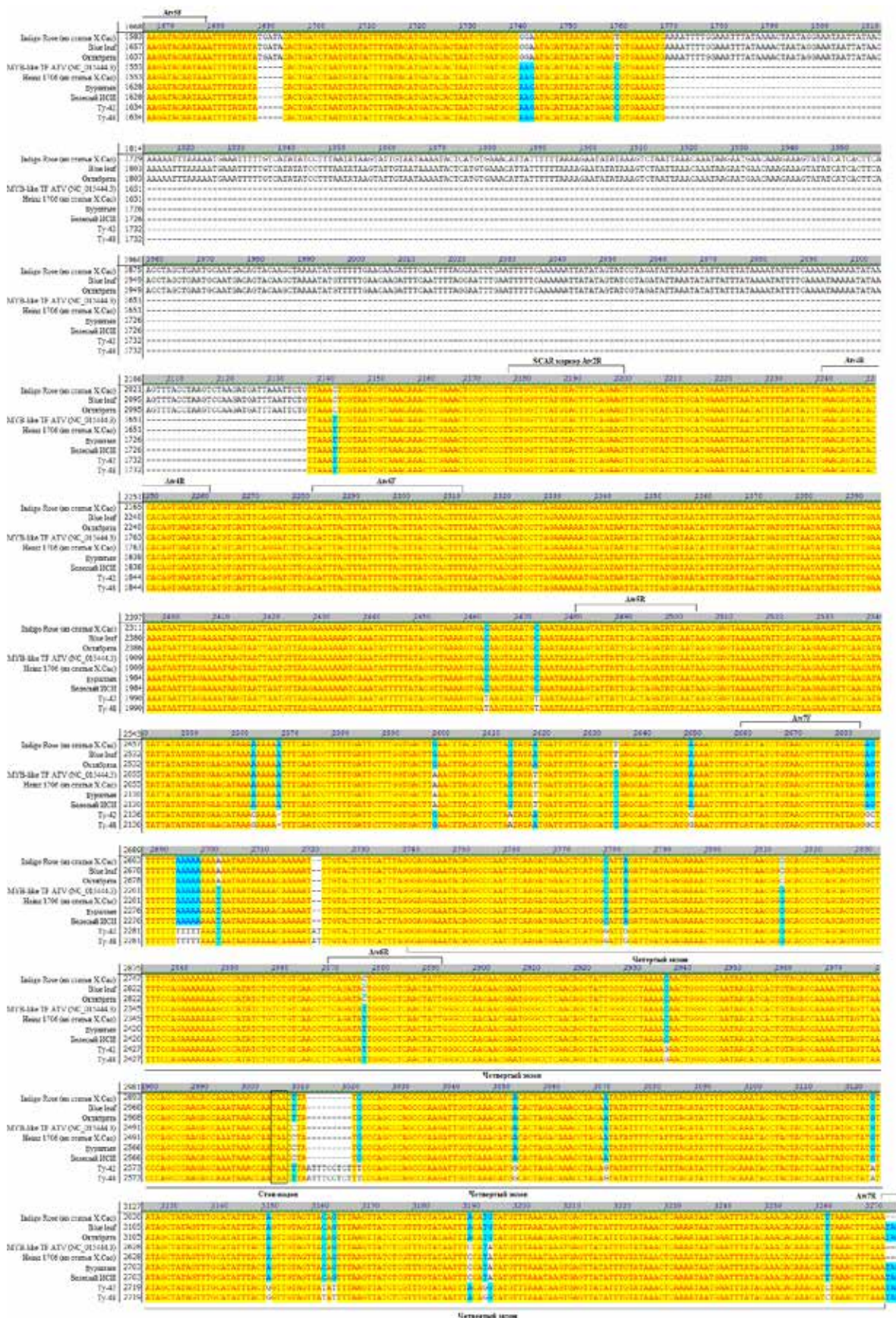


Рис. 8Б. Выравнивание нуклеотидных последовательностей гена *Atv*

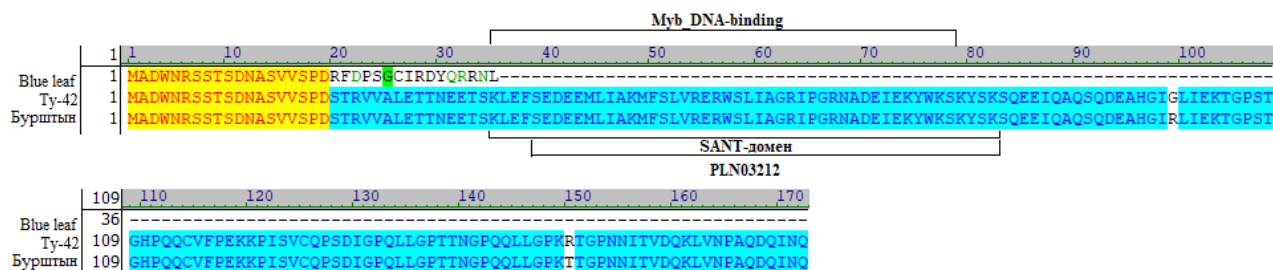


Рис. 9. Аминокислотные последовательности ATV TF и их регуляторные элементы, формируемые на основе аллелей *Atv*, *atv* и *Atv-Ins9*

Таблица 5

Результаты ДНК типирования популяций F₃ № 17 2020 × Индиго на наличие аллелей генов *Ant1*, *An2* и *Atv*

Название образца	<i>An2</i> <i>Myb75</i> — 580; <i>An2-Aft</i> — 186; <i>An2-Ins57</i> — 647	<i>Ant1</i> <i>Ant1</i> — 478; <i>ant1</i> — 208 + 271	<i>Atv</i> <i>Atv</i> — 460; <i>atv</i> — 852
45-9/6	580	208, 271	460
45-6/9	580	208, 271	460
45-19/2	186	478	852
45-19/7	186	478	852
45-12/6	186	478	460
45-12/7	186	478	460
45-21/1	580	208, 271	852
45-21/2	580	208, 271	852

и *ant1/ant1//Myb75/Myb75//atv/atv*, затем к образцам с генотипом *ant1/ant1//Myb75/Myb75//Atv/Atv*, окраска которых оставалась зеленой (рис. 11).

При выращивании растений в теплице у взрослых растений томата максимальное накопление антоцианов в плодах было у изучаемых образцов при наличии в генотипе следующих аллелей генов: *Ant1*, *An2-Aft* и *atv* (образцы Дзивосны, Октябрята — рис. 1). Усиление антоциановой окраски наблюдалось на вегетативных органах (у образцов с сочетанием аллелей *ant1/Myb75/atv*) и плодах диких форм томата (с сочетанием аллелей *Ant1/An2-Ins57*) при снижении температуры в конце вегетационного периода.

Анализируя особенности накопления антоцианов в плодах, можно предположить, что отличный характер накопления антоцианов у образца Бурштын может быть связан с взаимодействием трех аллелей *Ant1/An2-Aft/Atv*. Несмотря на одинаковые аллели *Ant1*, *An2-Aft*, *atv* у образцов Дзивосны и Октябрята, характер распределения антоцианов у них различен,

что связано с участием в проявлении данного признака других генов. Ранее при изучении полиморфизма гена транскрипционного фактора *GLK2* была установлена связь аллелей данного гена (*U*, *u*, *U-del52*) с распределением пигментов в плодах, в том числе антоцианов [11]. Наряду с геном *GLK2*, в регуляции накопления антоцианов участвуют гены *DDB1*, *Det1*, связанные с фенотипом «high pigment» [2]. Образец Октябрята содержит набор аллелей (*Ant1/An2-Aft/atv//Y/U/hp2^{ds}*) обеспечивающих максимальное накопление антоцианов в плодах и практически черную окраску при ярком солнечном освещении. У образца Дзивосны основные отличия в распределении и накоплении антоцианов от формы Октябрята обеспечиваются отсутствием аллеля *hp2^{ds}* и наличием у аллеля гена *SlMyb12*, а также аллеля *U-del52* гена *GLK2*.

Для оценки статистической достоверности эффективности разработанных молекулярных маркеров вышеуказанных аллелей выполнен анализ результатов фенотипической оценки и ДНК-типирования изучаемых популяций

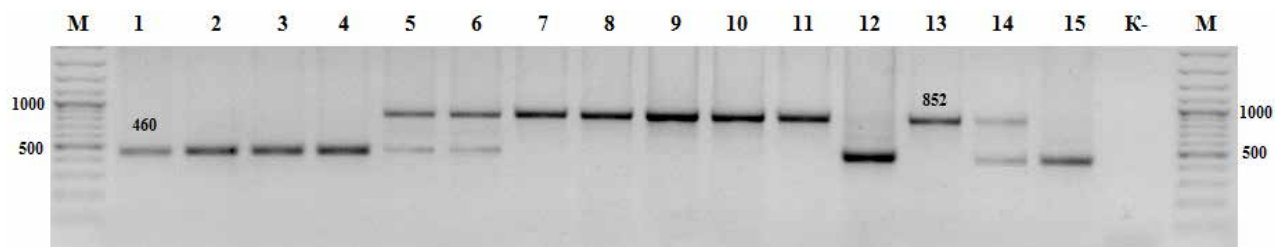


Рис. 10. Электрофореграмма ДНК-типирования образцов томата с SCAR маркером Atv2: 1–15 — типлируемые образцы популяции Т45; К — отрицательный контроль; М — маркер молекулярного веса



Рис. 11. Фенотип вегетативных органов растений с различным сочетанием аллелей генов *Ant1*, *An2* и *Atv*: А — 45-19/2 и 45-19/7 (*Ant1/Ant1//An2-Aft/An2-Aft//atv/atv*); Б — 45-12/6 и 45-12/7 (*Ant1/Ant1//An2-Aft/An2-Aft//Atv/Atv*); В — 45-9/6 и 45-6/9 (*ant1/ant1//Myb75/Myb75//atv/atv*); Г — 45-21/1 и 45-21/2 (*ant1/ant1//Myb75/Myb75//Atv/Atv*)

методом Хи-квадрат. В таблице 6 представлены результаты анализа популяции F_2 Индиго (*Ant1*, *An2-Aft*) × Линия № 17-2020 (*ant1*, *Myb75*). Общее число растений F_2 составило 79. Фенотипическое проявление антоциановой окраски плодов полностью соответствовало ожидаемому после типирования. Учитывая

тесное сцепление аллелей генов *Ant1* и *An2*, теоретически ожидаемое расщепление по генотипу: 1 *Ant1/An2-Aft* : 2 *Ant1/ant1//An2-Aft/Myb75* : 1 *Ant1/Myb75*; по фенотипу: 1 (сильная антоциановая окраска) : 2 (средняя антоциановая окраска) : 1 (отсутствие антоциановой окраски).

Таблица 6

Результаты анализа расщепления популяции F_2 Индиго × Линия № 17-2020 методом χ^2

Показатели	Расщепление			Сумма
	<i>Ant1/An2-aft</i>	<i>Ant1/ant1// An2/ Myb75</i>	<i>ant1/Myb75</i>	
Ожидаемое расщепление (H_0)	1	2	1	4
Наблюдаемые частоты (f)	21	39	19	79
Ожидаемые частоты (F)	19	41	19	79
Разность частот (f-F)	2	-2	0	-
Квадрат разности (f-F) ²	4	4	0	-
Отношение (f-F) ² /F	0,21	0,097	0	0,307 = χ^2
Фенотипическое проявление антоциановой окраски на плодах	Большое накопление антоциана	Среднее накопление антоциана в плодах	Отсутствие антоциана в плодах	

Примечание. Нулевая гипотеза (H_0) — ожидаемое расщепление: 1 *Ant1/An2-Aft* : 2 *Ant1/ant1//An2-Aft/Myb75* : 1 *Ant1/Myb75*. Число степеней свободы — $(c-1) \times (k-1) = (3-1) \times (2-1) = 2$; $\chi^2_{\text{теор}} = 6,0$; $\chi^2_{\text{факт}} = 0,307 < \chi^2_{\text{теор}} (6,0)$, следовательно, гипотеза верна и расщепление соответствует 1 : 2 : 1

Проведенный анализ подтвердил статистическую достоверность выявленной связи с фенотипическим проявлением признака «накопление антоцианов в плодах».

Таким образом, на основе данных молекулярного маркирования и адаптированных методик ДНК-типирования аллелей качества плодов *Ant1*, *An2* и *Atv* проведен скрининг популяций F_2 – F_3 , который позволил расширить знания по взаимодействию генетических систем накопления пигментов в вегетативных органах и плодах томата.

Заключение

Выполнено ресеквенирование генов *Ant1*, *An2* и *Atv* Мyb-транскрипционных факторов на коллекции образцов *S. lycopersicum* и близких диких видов томата с различным накоплением антоцианов в плодах. Подтверждены отличительные полиморфизмы между аллелями *Ant1* и *ant1*. На основе инсерции 4 п. н. разработан новый SCAR *Ant1.1* (FAM) маркер для выявления аллелей *Ant1* и *ant1*. Показана полная идентичность результатов ДНК-типирования, полученных с помощью разработанного маркера и ранее используемого CAPS маркера *Ant1-NcoI* [2].

В генотипе образцов изучаемой коллекции *S. lycopersicum* выявлены известные аллели *Myb75* и *An2-Aft* гена *An2*. Впервые выявлены отличия в структуре гена *An2* у *S. glandulosum* (*An2-Ins57*). Показаны изменения в первичной структуре белковой последовательности, кодируемой данным аллелем: шесть аминокислотных замен, две из которых расположены в области первого и второго ДНК-связывающих доменов, что может влиять на эффективность связывания с промотором и экспрессию целевых генов. Разработаны новые SCAR *An2-AFT*(OM) и SCAR *An2-4F/R* молекулярные маркеры для ДНК-типирования аллелей *An2-Aft*, *An2-Ins57* и *Myb75*. SCAR *An2-AFT*(OM) охватывает область SNP замены в первом экзоне, изменяющей аминокислотный состав белка в области первого ДНК-связывающего домена, а также две инсерции и делеция в первом и втором интронах общим размером 14 п. н., соответственно. Преимуществом данного маркера является непосредственная связь с полиморфизмом, изменяющим функцию гена, но для разделения

продуктов амплификации требуется полиакриламидный гель. SCAR *An2-4F/R* охватывает область крупных делеций во втором интроне, характерных для аллеля *Myb75*. Типирование с помощью данного маркера позволяет четко разделить аллели гена *An2*, выявленные в изучаемой коллекции, с использованием обычной ПЦР и разгонкой продуктов в агарозном геле.

Апробирован известный в литературе ATV-In(OM) [8] и разработан новый *Atv2* SCAR маркер, которые позволяют успешно типировать известные аллели гена *Atv*. Разработка нового маркера позволяет разделить продукты ПЦР в агарозном геле, в отличие от маркера ATV-In (OM).

На основе данных молекулярного маркирования аллелей генов *Ant1*, *An2*, *atv* в популяциях F_2 – F_3 изучаемых гибридов и оценки фенотипического проявления признаков на различных этапах онтогенеза, связанных с накоплением антоцианов в растениях, показаны высокая эффективность разработанных молекулярных маркеров, тесное сцепление аллелей генов *Ant1* и *An2* (*Ant1* и *An2-Aft*, *ant1* и *Myb75*). Подтверждено повышение накопления антоцианов в плодах и вегетативных органах при усилении потока солнечного света, а также при понижении температуры в конце вегетационного периода.

Выявлены особенности накопления антоцианов в растениях томата в зависимости от аллелей генов *Ant1*, *An2*, *Atv*. Максимальное накопление антоцианов в вегетативных органах и плодах наблюдается у образцов с аллелями *Ant1/An2-Aft/atv* в генотипе. Сочетание аллелей *ant1/Myb75/Atv* связано с отсутствием антоцианов в различных частях растения. Комбинация аллелей *Ant1/An2-Aft/Atv* обеспечивает слабое накопление антоцианов в вегетативных органах, но высокое их накопление в кожице плодов. Получен новый селекционный материал для создания форм с повышенным накоплением антоцианов и высокими антиоксидантными свойствами

Список использованных источников

1. Overexpression of petunia chalcone isomerase in tomato results in fruit containing increased levels of flavonols // S. R. Muir [et al.] / Nat Biotechnol: 2001. – Vol. 19, iss. 5. – P. 470–474. – DOI: 10.1038/88150

2. Molecular Aspects of Anthocyanin fruit Tomato in Relation to *high pigment-1* // M. Sapir [et al.] / Journal of Heredity: 2008. – Vol. 99, iss. 3. – P. 292–303. – DOI: 10.1093/jhered/esm128
3. Activation tagging in tomato identifies a transcriptional regulator of anthocyanin biosynthesis, modification, and transport // H. V. Mathews [et al.] / Plant Cell: 2003. – Vol. 15, iss. 8. – P. 1 689–1 703. – DOI: 10.1105/tpc.012963
4. Characterization of tomatoes expressing anthocyanin in the fruit // P. J. Mes [et al.] / J. Am. Soc. Hortic Sci.: 2008. – Vol. 133, iss. 2. – P. 262–269. – DOI: 10.21273/JASHS.133.2.262
5. *Anthocyanin1* from *Solanum chilense* is more efficient in accumulating anthocyanin metabolites than its *Solanum lycopersicum* counterpart in association with the anthocyanin fruit phenotype of tomato // G. Schreiber [et al.] / Theor. Appl. Genet.: 2012. – Vol. 124, iss. 2. – P. 295–307. – DOI: 10.1007/s00122-011-1705-6
6. Colanero, S. The *atroviolacea* Gene Encodes an R3-MYB Protein Repressing Anthocyanin Synthesis in Tomato Plants // S. Colanero, P. Perata, S. Gonzali / Front. Plant Sci.: 2018. – Vol. 9:830. – DOI: 10.3389/fpls.2018.00830
7. GenBank [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>. – Дата доступа: 01.01.2024.
8. A putative R3 MYB repressor is the candidate gene underlying *atroviolacium*, a locus for anthocyanin pigmentation in tomato fruit // X. Cao [et al.] / J Exp Bot.: 2017. – Vol. 68(21–22). – P. 5 745–5 758. – DOI: 10.1093/jxb/erx382
9. Бабак, О. Г. Технология маркер-сопутствующего отбора форм томата с высокими биохимическими и технологическими свойствами плодов: методические рекомендации / О. Г. Бабак, Н. А. Некрашевич, Н. В. Анисимова, Е. В. Дрозд, К. К. Яцевич, А. В. Кильчевский. – Минск: Министерство сельского хозяйства и продовольствия Республики Беларусь; Национальная академия наук Беларуси; Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси Право и экономика, 2023. – 74 с.
10. Доспехов, Б. А. Методика полевого опыта (с основами статистической обработки результатов исследований). – 5-е изд., доп. и перераб. – М.: Агропромиздат, 1985. – 351 с.
11. Бабак, О. Г. Новый аллель гена *Golden 2-Like*, его фенотипическое проявление и селекционное значение у *Solanum lycopersicum* // О. Г. Бабак [и др.] / Молекулярная и прикладная генетика : сб. ст. / Ин-т генетики и цитологии НАН Беларуси; А. В. Кильчевский (гл. ред.) [и др.]. – Минск, 2023. – Т. 34. – С. 6–16.

O. G. Babak, E. V. Drozd, N. A. Nekrashevich, N. V. Anisimova, K. K. Yatsevich, A. V. Kilchevsky

DEVELOPMENT OF MOLECULAR MARKERS FOR THE ACCUMULATION OF ANTHOCYANINS IN FRUITS AND STUDYING THE SPECIFICS OF *ANT1*, *AN2* AND *ATV* GENE INTERACTION IN *SOLANUM LYCOPERSICUM*

State Scientific Institution

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

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

e-mail: o.babak@igc.by

Resequencing of *Ant1*, *An2* and *Atv* MYB TF genes was performed on the collection of *S. lycopersicum* accessions and related wild tomato species with the different accumulation of anthocyanins in fruits. New molecular markers for the DNA typing of *Ant1* (SCAR Ant1.1-FAM), *An2* (SCAR An2-AFT (OM), SCAR An2-4F/R), and *Atv* (SCAR Atv2) alleles were developed, and their high efficiency was confirmed. A close linkage of the *Ant1* and *An2-Aft*, *ant1* and *Myb75* alleles of *Ant1* and *An2* genes was shown. A new allele of the *An2* gene was discovered in *S. glandulosum* (*An2-Ins57*) the distinctive polymorphisms of which from *Myb75* lead to six amino acid substitutions in the protein sequence; two of them are located in the region of the first and second DNA-binding domains. The maximum accumulation of anthocyanins in vegetative organs and fruits was revealed in the accessions with *Ant1/An2-Aft/atv* alleles in the genotype. The combination of *ant1/Myb75/Atv* alleles is associated with the absence of anthocyanins in various plant parts. The combination of *Ant1/An2-Aft/Atv* alleles provides a weak accumulation of anthocyanins in vegetative organs and their high accumulation in the skin of fruits.

Keywords: *Solanum lycopersicum*, *Ant1*, *An2* and *Atv* genes' polymorphism, regulation of anthocyanin synthesis, DNA markers.

Дата поступления в редакцию: 08 февраля 2024 г.

О. А. Орловская, Л. В. Хотылёва, А. В. Кильчевский

ВЛИЯНИЕ ИНТРОГРЕССИИ ЧУЖЕРОДНОГО ГЕНЕТИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА НА ОСНОВНЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ КАЧЕСТВА ЗЕРНА МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ

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 основные признаки качества зерна (содержание белка, массовая доля и качество клейковины, стекловидность, масса 1 000 зерен) сортов яровой мягкой пшеницы, образцов тетраплоидных и гексаплоидных видов рода *Triticum*, а также 32 интрогрессивных линий, полученных с их участием. В среднем за пятилетний период наблюдений сородичи пшеницы значительно превосходили сорта мягкой пшеницы по содержанию белка и клейковины в зерне, качеству клейковины, но уступали по массе 1 000 зерен. В группе интрогрессивных линий содержание белка и клейковины, индекс деформации клейковины, стекловидность, масса 1 000 зерен были ближе к значениям сортов. Выделены линии с чужеродным генетическим материалом, превышающие исходные сорта по изученным признакам качества зерна и представляющие интерес для селекции мягкой пшеницы.

Ключевые слова: сородичи пшеницы, интрогрессивные линии мягкой пшеницы, качество зерна.

Введение

Зерно пшеницы является основой для таких продуктов питания, как крупы, мука, хлеб, хлебобулочные и кондитерские изделия, которые входят в ежедневный рацион питания каждого человека. В связи с этим качеству зерна данной культуры уделяется пристальное внимание. К наиболее важным признакам, на основе которых можно проследить формирование и изменчивость качества зерна мягкой пшеницы *T. aestivum* L., относятся стекловидность, содержание белка, массовая доля и качество клейковины, масса 1 000 зерен. Стекловидность в первую очередь имеет большое значение для оценки мукомольных свойств зерна. Стекловидный эндосперм обладает большей механической прочностью и крупобразующей способностью, чем мучнистый, и позволяет получать муку высокого качества. Кроме того, стекловидные зерна отличаются повышенной углеводно-амилазной активностью, что связано с разрушением крахмальных зерен в процессе помола и большей их доступностью к действию амилаз [1]. Хлебопекарные свойства мягкой пшеницы в значительной степени определяются ее белковостью и коррелирующим с этим пока-

зателем количеством клейковины. Содержание общего белка у сильных пшениц должно быть не менее 13,5%, а клейковины — не менее 28% [2]. Большую роль играет также качество клейковины, определяемое ее физико-химическими показателями (растяжимость, упругость, эластичность, вязкость). Одним из методов, позволяющих быстро и точно установить хлебопекарные достоинства пшеницы, является метод определения качества клейковины по величине деформации ее шарика под действием нагрузки сжатия с использованием прибора ИДК (измеритель деформации клейковины). Прибор фиксирует упругие свойства клейковины, по результатам которых производится классификация ее на группы качества. Наиболее ценными для производства хлебопекарной муки являются сорта мягкой пшеницы с сильной клейковиной (I группа качества по прибору ИДК). Однако в мировом производстве пшеницы на долю «сильных» сортов приходится всего лишь 15–20%, на долю «слабых» — 50–55%, то есть половина объема производимого в мире зерна пшеницы может давать качественный хлеб только при добавлении к нему высококачественного зерна пшеницы [1]. Одним из способов улучшения

пшеницы по биологической ценности и хлебопекарным свойствам зерна является использование дикорастущих и культурных сородичей *T. aestivum* для расширения генофонда пшеницы. Однако оценке признаков качества зерна сородичей пшеницы посвящено пока немного работ [3, 4]. Так, Zhang с соавторами при изучении 27 генотипов дикой полбы выявили значительные отличия между ними по ряду реологических свойств теста, и, несмотря на отсутствие D-генома, отдельные образцы обладают высоким качеством клейковины [3].

С целью обогащения и улучшения генофонда мягкой пшеницы в скрещивания с сортами *T. aestivum* нами были привлечены образцы видов рода *Triticum* (*T. dicoccoides*, *T. dicoccum*, *T. durum*, *T. spelta*, *T. kiharae*). Цель данного исследования состояла в оценке влияния чужеродного генетического материала на основные признаки качества зерна интрогрессивных линий яровой мягкой пшеницы.

Материалы и методы

В исследование включены пять сортов яровой мягкой пшеницы (Рассвет, Саратовская 29, Фестивальная, Chinese Spring, Белорусская 80), образцы тетраплоидных *T. dicoccoides*, *T. dicoccoides* к-5199, *T. dicoccum* к-45926, *T. durum* и гексаплоидных *T. spelta* к-1731, *T. kiharae* видов рода *Triticum*, а также 32 интрогрессивные линии, полученные нами. Из них 12 линий создано с участием образца *T. durum* (183/2-2 и 184/1-6 CS × *T. durum*; 190/4-1, 190/5-3, 190/6-1, 191/6-3, 195-3, 196-1, 202-2, 200-3 *T. durum* × CS; 221-1 и 226-7 *T. durum* × Белорусская 80); семь линий создано с участием *T. dicoccoides* (29 Рассвет × *T. dicoccoides* к-5199; 8 Саратовская 29 × *T. dicoccoides*; 11-1, 13-3, 15-7-1, 15-7-2, 16-5 *T. dicoccoides* × Фестивальная); шесть линий создано с участием *T. kiharae* (19, 20-1, 25-2 *T. kiharae* × Саратовская 29; 28, 34-1, 34-2 *T. kiharae* × Фестивальная); пять линий создано с участием *T. dicoccum* (1-3, 2-7 *T. dicoccum* к-45926 × Фестивальная, 206-2, 208-3, 213-1 Pitic S62 × *T. dicoccum* к-45926) и две линии создано с участием *T. spelta* (7 *T. spelta* к-1731 × Саратовская 29, 1-8 *T. spelta* к-1731 × Рассвет). Образцы чужеродных доноров получены из коллекции ВИР. Растения выращивали на экспериментальных полях Института генетики и цитологии

НАН Беларуси в 2017–2019 гг., 2021–2022 гг. (г. Минск) на дерново-подзолистой супесчаной почве. Данные о среднесуточных температурах и количестве выпавших осадков использованы для расчета суммы активных температур (САТ) и гидротермического коэффициента Селянинова (ГТК) [5].

Содержание белка и клейковины в зерне, качество клейковины (показатель ИДК — индекс деформации клейковины) и стекловидность зерна пшеницы определяли на инфракрасном анализаторе «Инфра ЛЮМ ФТ-12» (Люмэкс, Россия).

Результаты эксперимента обобщены с использованием методов описательной статистики, двухфакторного дисперсионного и корреляционного анализов. Статистические процедуры реализованы в программных пакетах Statistica 10.0 и MS Excel. Долю влияния генетических и средовых факторов в общей изменчивости анализируемых признаков рассчитывали на основании результатов двухфакторного дисперсионного анализа по формуле, предложенной П. Ф. Рокицким [6]. Оценку различий показателей качества зерна между группами (сорта, образцы видов *Triticum*, интрогрессивные линии) проводили с помощью дисперсионного анализа и критерия Тьюки.

Результаты и обсуждение

Мы изучили такие важные показатели качества зерна мягкой пшеницы, как содержание белка и сырой клейковины в зерне, качество клейковины, стекловидность зерна и масса 1 000 зерен в течение пяти лет. Для оценки эффектов генотипа, условий года выращивания и их взаимодействия в изменчивость признаков качества зерна проведен двухфакторный дисперсионный анализ. Установлено достоверное влияние всех трех факторов на формирование изученных признаков ($P < 0,001$). Показано преобладание роли генотипа в вариации содержания белка, клейковины и массы 1 000 зерен, при этом общее содержание белка определялось преимущественно генотипом, а для содержания клейковины и массы 1 000 зерен выявлен высокий вклад как генетических факторов, так и погодных условий (рис. 1). Условия года выращивания вносят наибольший вклад в изменчивость качества клейковины (61,29%), а генотип-средовые

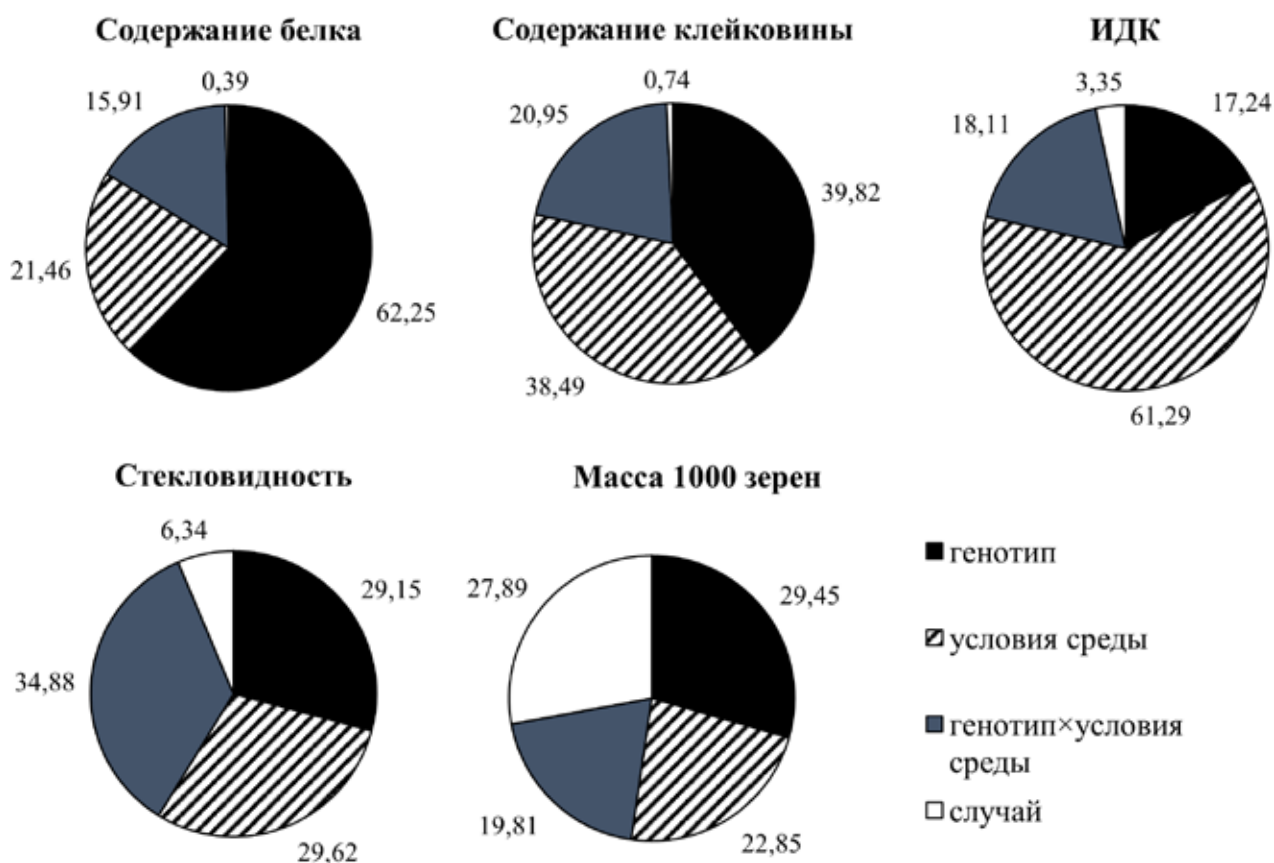


Рис. 1. Доля влияния факторов в общей изменчивости признаков качества зерна пшеницы

взаимодействия — стекловидности (34,88%).

Погодные условия вегетационных периодов 2017–2019 гг. и 2021–2022 гг. отличались по температурному режиму и количеству осадков, причем наиболее существенные различия отмечены в мае и июле (табл. 1). Для формирования зерна растения пшеницы ремобилизируют азот и углеводы из флагового листа, в связи с чем содержание белка в зерне зависит от интенсивности фотосинтеза и площади фотосинтетической поверхности. Недостаток тепла и переувлажнение почв в мае 2021–2022 гг. (период роста вегетативной массы яровой пшеницы) привели к существенному снижению содержания белка и клейковины, качества клейковины пшеницы. Засуха в июле 2021 г. (период налива зерна) также оказала негативное влияние на формирование исследованных признаков. Известно, что повышение температуры приводит к уменьшению накопления ассимилятов в зерне и массы зерновки [7]. Самое высокое содержание белка и клейковины отмечено в 2018 г., а самое низкое в 2021–2022 гг. (рис. 2). Схожая тенденция выявлена для ка-

чества клейковины. Согласно значениям ИДК выделяют сильную клейковину (45–77 усл. ед., I группа качества), удовлетворительно слабую (18–102 усл. ед., II группа качества) и неудовлетворительно слабую (более 102 усл. ед., III группа качества). Высокий индекс деформации клейковины характерен для изученных генотипов в 2021 и 2022 гг. — 87,14 усл. ед. и 86,19 усл. ед., в то время как в остальной период исследования ИДК находился в интервале 77,43–81,51 усл. ед. Самая низкая стекловидность и масса 1 000 зерен мягкой пшеницы выявлена в 2021 г. (рис. 2).

Оценка различий качественных показателей зерна (среднее за пять лет) между группами (сорта, образцы видов рода *Triticum* и интрогрессивные линии) на основании дисперсионного анализа и теста множественных сравнений Тьюки показала, что сородичи пшеницы значительно превосходили сорта мягкой пшеницы по содержанию белка и клейковины в зерне, качеству клейковины. Масса 1 000 зерен, напротив, была достоверно выше в группе сортов (рис. 2).

Таблица 1

Метеонаблюдения за май–август 2017–2019 и 2021–2022 гг. в регионе г. Минск (Беларусь): широта 53,96; долгота 27,70; высота над уровнем моря 231 м

Месяц/год	Температура воздуха, °С		Сумма активных температур (>10 °С)	Осадки, мм		Гидротермический коэффициент, мм/°С
	средняя	отклонение от климатической нормы		сумма	% климатической нормы	
2017						
май	13,1	-0,2	381,1	28	43	0,4
июнь	16,4	0	481,3	53	82	1,1
июль	17,6	-0,9	546,3	150	168	2,8
август	18,8	1,3	583,2	83	121	1,4
2018						
май	17,4	4,1	540	53	82	1
июнь	17,7	1,3	532,2	46	52	0,9
июль	19,6	1,1	608,5	169	189	2,8
август	20,1	2,6	623,9	59	86	0,9
2019						
май	13,8	0,5	358,2	70	107	0,7
июнь	20,3	3,9	608,1	55	61	0,9
июль	16,5	-2,0	510,9	120	135	2,4
август	17,0	-0,5	527,7	91	134	1,7
2021						
май	11,5	-1,9	288,4	113	171	3,9
июнь	19,2	2,8	575,7	84	107	1,2
июль	21,9	3,4	679,9	41	43	0,6
август	16,9	-0,6	507,9	74	104	1,5
2022						
май	10,8	-2,6	245,4	87	132	3,5
июнь	18,3	1,2	550,2	50	64	0,9
июль	17,9	-1,2	554,0	91	94	1,6
август	20,5	2,3	592,8	12	17	0,2

Примечание. сумма активных температур — показатель, характеризующий количество тепла и выражающийся суммой средних суточных температур воздуха выше 10 °С; гидротермический коэффициент Селянинова — характеристика уровня влагообеспеченности территории, значения которого определяются по формуле: $ГТК = P / 0,1 \times T > 10 \text{ } ^\circ\text{C}$, где $T > 10 \text{ } ^\circ\text{C}$ — сумма средних суточных температур воздуха за период с температурами воздуха выше 10 °С, P — количество осадков за тот же период, в мм

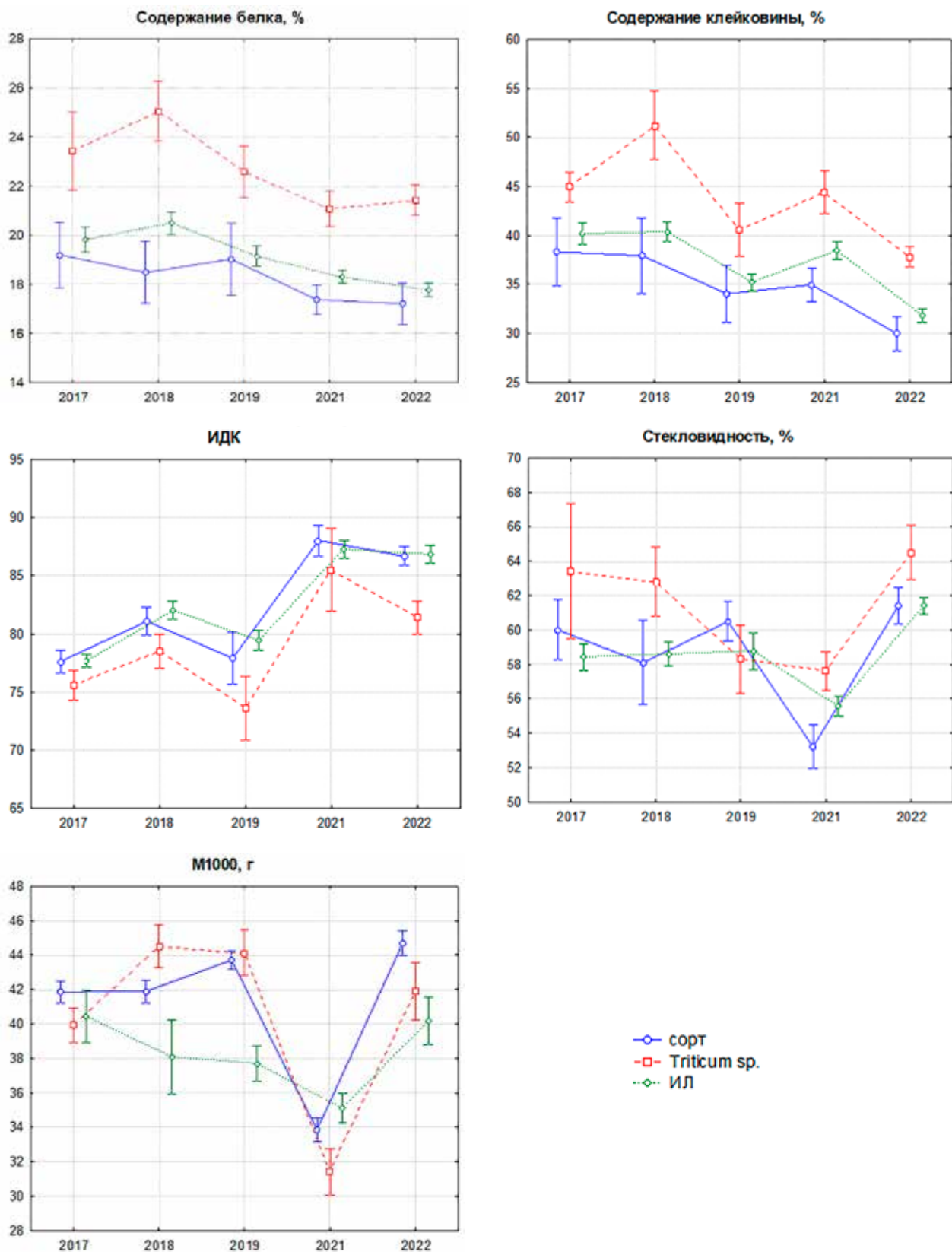


Рис. 2. Диаграммы размаха показателей качества зерна трех групп генотипов пшеницы (сорта, образцы видов *Triticum*, интрогрессивные линии) в пятилетний период исследования
ИЛ — интрогрессивные линии; о — среднее; I — размах

Один из основных показателей качества зерна, определяющий технологические свойства и питательную ценность готовых изделий — содержание белка. На протяжении всего периода исследования образцы видов рода *Triticum* накапливали белка значительно больше, чем сорта мягкой пшеницы, и в среднем данный показатель составил 22,71% и 18,25% соответственно. Особенно высокие значения по белковости зерна выявлены для образцов дикорастущей и культурной полбы: *T. dicoccoides* (23,8%), *T. dicocum* к-45926 (23,54%), *T. dicoccoides* к-5199 (23,1%). Среди родительских сортов можно отметить сорт Фестивальная (20,82%), который превосходил по этому показателю остальные генотипы данной группы (16,91–18,19%). Полученные результаты подтверждаются данными литературы, согласно которым многие родственные виды *T. aestivum* характеризуются более высоким содержанием белка в зерне по сравнению с культивируемыми сортами [8]. Особенно широко изучен данный признак у дикорастущей полбы *T. dicoccoides* [9, 10]. Есть сведения о значительном накоплении белка в зерне у *T. spelta*. Например, согласно литературным данным по белковости зерна спельта превышает *T. aestivum* на 8–10%, *T. shaerococcum* — на 3–8%, *T. petropavlovskyi* — на 2–6% [11].

Из 32 проанализированных интрогрессивных линий достоверно превосходили родительский сорт мягкой пшеницы по содержанию белка в зерне 17 генотипов в 2017 г., 20 — в 2018 г., по 15 — в 2019 и 2021 гг. и 16 — в 2022 г. Линии 13-3, 29, 190-4/1, 190-5/3, 196-1, 221-1, 226-7, 7, 19, 25-2 на протяжении всего периода исследования накапливали больше белка в зерне, чем исходный сорт *T. aestivum*. Наиболее значительное превышение этого показателя отмечено у линий 13-3 *T. dicoccoides* × Фестивальная, 19 и 25-2 *T. kiharae* × Саратовская 29, 7 *T. spelta* к-1731 × Саратовская 29. Ранее нами установлено, что линии 13-3, 19, 25-2 и 7 унаследовали от образцов видов-сородичей функциональный аллель *NAM-B1*, который обеспечивает высокое содержание белка в зерне в различных экологических условиях. В связи с тем, что культивируемые в настоящее время сорта, как правило, не имеют функционального аллеля *NAM-B1*, полученные нами интрогрессивные

линии пшеницы с данным аллелем представляют большой интерес для повышения качества зерна пшеницы [12]. Следует отметить, что интрогрессивные линии не превышали по уровню содержания белка лучшую родительскую форму (сородичей пшеницы), что согласуется с данными других ученых. Известно, что при скрещивании генотипов пшеницы с высоким и низким содержанием белка у гибридов наблюдается наследование данного признака худшего из родителей [11, 13]. Наиболее высокие показатели содержания белка среди интрогрессивных линий выявлены у линий на основе сорта Фестивальная (17,37–23,74%), который характеризовался максимальным уровнем белка среди родительских сортов пшеницы (20,82%). Кроме того, 5 из 10 данных линий в среднем за пять лет имели содержание белка выше 20%. При этом в группе линий на основе Chinese Spring с более низким значением белковости (17,74%) этот показатель находился в диапазоне 16,75–19,92%.

Для качества зерна пшеницы большое значение имеют массовая доля и индекс деформации клейковины, т. к. от количества и качества клейковины зависят физические свойства теста и качество хлеба. Так же как и содержание белка, количество клейковины в группе сородичей пшеницы (43,78%) было достоверно выше, чем в группе исследованных сортов (35,05%). У образцов рода *Triticum* данный показатель варьировал от 39,91 до 46,43%, а у сортов не достигал 35,0%, за исключением сорта Фестивальная (41,57%), который характеризовался и самым высоким уровнем накопления белка в зерне. В среднем за весь период наблюдений в группе интрогрессивных линий содержание клейковины составило 37,20%, что ближе к значениям сортов. При этом в 2018 и 2022 гг. выявлено по 15 интрогрессивных линий, которые достоверно превышали исходный сорт по данному показателю, в 2019 г. таких генотипов было 16, а в 2021 и 2017 гг. — 20 и 21 соответственно. Высокое содержание клейковины отмечено для линий, созданных на основе образца *T. kiharae* с наибольшим уровнем накопления клейковины среди всех исследованных генотипов (46,43%). Например, линии 19 *T. kiharae* × Саратовская 29, 28 и 34-1 *T. kiharae* × Фестивальная в среднем за пять лет имели массовую долю клей-

ковины более 42%, а в наиболее благоприятные 2017–2018 гг. — более 48%. Также можно выделить линии 13-3 *T.dicoccoides* × Фестивальная (42,27%), 195-3 *T.durum* × CS (40,5%) и 7 *T.spelta* к-1731 × Саратовская 29 (40,0%).

Клейковина хорошего качества (сильная клейковина) не должна быть слишком плотной или чрезмерно мягкой и имеет индекс деформации 45–77 усл. ед. (I группа качества), она характеризуется отличной эластичностью и позволяет выпекать хлеб высокого качества. Удовлетворительно слабая клейковина 80–102 усл. ед. (II группа качества) также может использоваться в хлебопечении, но требует дополнительных приемов, направленных на ее укрепление (добавление улучшителей). Неудовлетворительно слабая клейковина — более 102 усл. ед. (III группа качества) слишком растягивается, тесто из муки с такой клейковиной сильно расплывается и не подходит для выпечки хлеба, но подходит для производства кондитерских изделий. В среднем за весь период наблюдений сильная клейковина выявлена только для образцов *T.dicoccum* к-45926 (75,6 усл. ед. ИДК) и *T.kiharae* (77,7 усл. ед. ИДК) среди всех изученных генотипов. У остальных родственных видов мягкой пшеницы данный показатель находился в диапазоне 79,4–82,4 усл. ед. ИДК, у сортов — 81,1–83,8 усл. ед. ИДК, у интрогрессивных линий — 78,5–86,3 усл. ед. ИДК, что соответствует II группе качества клейковины. Можно отметить, что в наиболее благоприятные 2017 и 2018 гг. все сородичи пшеницы, за исключением спельты, формировали клейковину I группы качества. Такая же тенденция отмечена для сорта Белорусская 80. Также как и количество, качество клейковины интрогрессивных линий было ближе к значениям родительских сортов и в среднем составило 82,67 усл. ед. ИДК, но количество генотипов, превышающих исходный сорт по качеству клейковины, было меньше. Так, в 2017 г. таких генотипов выявлено только 6, в 2018 г. — 10, в 2019 г. — 11, в 2021 г. — 9 и в 2022 г. — 7. В среднем за весь период наблюдений наилучшие реологические свойства клейковины среди интрогрессивных линий отмечены для линий 20-1 (78,5 усл. ед. ИДК), 2-7 (79,5 усл. ед. ИДК), 13-3 (79,8 усл. ед. ИДК), 1-3 (80,1 усл. ед. ИДК), 7 (80,6 усл. ед. ИДК), 226-7 (80,8 усл. ед. ИДК), 34-1 (81,1 усл. ед.

ИДК), 25-2 (81,5 усл. ед. ИДК). Данные линии по этому показателю значимо превосходили родительские сорта пшеницы, а в отдельные годы их ИДК составлял менее 77 усл. ед.

Известно, что существенное влияние на качество хлеба оказывают высокомолекулярные субъединицы запасных белков глютелинов (HMW-GS), которые кодируются локусами *Glu-1* (*Glu-A1*, *Glu-B1*, *Glu-D1*), расположенными на длинных плечах хромосом первой гомеологической группы [14]. Проведенная нами ранее идентификация состава HMW-GS 19 интрогрессивных линий и их родительских форм выявила у образцов *T.dicoccoides*, *T.spelta* и *T.kiharae* не характерные для сортов *T.aestivum* субъединицы [15, 16]. Особый интерес представляют новые субъединицы 1Ax + 1Ay, имеющиеся у дикой полбы и синтетической пшеницы *T.kiharae*, т. к. у современных сортов в локусе *Glu-A1* отмечен очень низкий полиморфизм, а ген, кодирующий субъединицу 1Ay, не экспрессируется вовсе. Выявленные у *T.kiharae* новые 1Dx и 1Du субъединицы также имеют ценность, т. к. аллельный состав локуса *Glu-D1* у современных сортов мягкой пшеницы очень ограничен [17], при этом считается, что аллели локуса *Glu-D1* оказывают наибольший вклад в формирование хлебопекарных свойств [18]. У 10 из 19 интрогрессивных линий обнаружены HMW-GS родственных видов, при этом большинство из них превышали родительский сорт по качеству клейковины (линии 13-3, 2-7, 226-7, 7, 34-1, 25-2).

Стекловидное зерно, как правило, содержит больше белка, чем мучнистое, в связи с чем считается более ценным. Большой выход муки лучшего качества получают из зерна со стекловидностью выше 60% [19]. В нашем исследовании стекловидность сородичей пшеницы была в пределах 59,9–64,3%, что несколько выше, чем у сортов мягкой пшеницы (56,3–60,9%). Наиболее высокое значение по данному признаку было у культурной полбы (64,3%). У гибридов стекловидность варьировала от 54,4 до 62,6%. Значимое превышение над исходным сортом выявлено для 6 генотипов в 2017 г., по 10 — в 2018 и 2019 гг., 21 — в 2021 г. и 11 — в 2022 г. В среднем за пять лет стекловидность более 60% характерна для линий 13-3, 15-7-1, 2-7, 190/4-1, 195-3, 196-

1, 226-7, при этом большинство из них создано с участием *T. durum*. Известно, что высокая стекловидность является биологической особенностью твердой пшеницы [20]. Если для зерна *T. aestivum* высокого качества (1-й и 2-й классы) стекловидность должна быть не менее 60%, то для *T. durum* — не менее 85% [2].

Масса 1 000 зерен показывает выполненность и крупность зерна. Крупное зерно дает больший выход муки, т. к. содержит меньше оболочек. Считается, что масса 1 000 зерен пшеницы более 35 г — высокая; более 25 г — средняя; менее 25 г — ниже средней. В среднем за весь период наблюдения для всех трех групп генотипов пшеницы масса 1 000 зерен превышала 35 г. Для сородичей пшеницы данный показатель составил 38,3 г, что, однако, статистически ниже, чем у сортов (40,4 г) и интрогрессивных линий (41,2 г). В 2021 г., в котором сложились самые неблагоприятные условия для формирования крупного зерна, масса 1 000 зерен в группе родственных видов была несколько выше, чем в других группах (рис. 2). Среди родительских генотипов образец *T. kiharae* по массе 1 000 зерен превышал не только других сородичей пшеницы, но и сорта. Так, для *T. kiharae* данный показатель составил 44,8 г, для остальных родственных видов — от 35,6 до 38,3 г, для сортов — от 35,5 до 44,3 г. Интрогрессивные линии, как правило, были ближе к сортам на протяжении всего периода исследования, за исключением 2021 г. (рис. 2). В 2017 и 2022 гг. выявлено по 13 интрогрессивных линий, которые достоверно превышали исходный сорт по массе 1 000 зерен, в 2018 г. таких генотипов было 11,

а в 2019 и 2022 гг. — 12 и 13 соответственно. В среднем за все годы исследования у интрогрессивных линий этот признак варьировал от 27,7 до 52,8 г, при этом у 23 из 32 линий масса 1 000 зерен превышала 40 г. Самые высокие значения отмечены для линий, созданных с участием твердой пшеницы (195-3 (52,8 г), 196-1 (48,0 г), 226-7 (46,0 г)) и *T. kiharae* (25-2 (46,7 г) и 20-1 (45,9 г)). Только две линии имели массу 1 000 зерен менее 30 г: 11-1 (27,7 г) и 13-3 (28,0 г).

Силу и направления связи между изученными признаками качества зерна оценивали с использованием линейного коэффициента корреляции Пирсона (табл. 2).

Со всеми изученными признаками значимо ассоциирован только уровень накопления белка. С содержанием клейковины установлена тесная положительная связь, а с остальными признаками — связи средней силы. Высокая положительная корреляция между содержанием белка и клейковины в зерне показана в работах других ученых [21, 22]. Известно, что в клейковине на долю белков приходится в среднем 83%, в том числе клейковинообразующих — 79,5%, а альбуминов и глобулинов — 4% [23]. Есть сведения о наличии общих локусов, ассоциированных с содержанием белка и клейковины в зерне пшеницы [24, 25].

Наименьшее число статистически значимых корреляционных связей выявлено для массы 1 000 зерен. Нами не установлено достоверных связей данного признака с количеством и качеством клейковины, стекловидностью. Похожие результаты получены зарубежными учеными при изучении 20 генотипов пшеницы

Таблица 2

Коэффициенты корреляции Пирсона между признаками качества зерна исследованных генотипов пшеницы

	Содержание белка	Содержание клейковины	ИДК	Стекловидность	Масса 1 000 зерен
Содержание белка	1,0000	0,9159**	-0,4201*	0,6324**	-0,4095*
Содержание клейковины	0,9159**	1,0000	-0,3284*	0,5604**	-0,1961
ИДК	-0,4201*	-0,3284*	1,0000	-0,3505*	0,2402
Стекловидность	0,6324**	0,5604**	-0,3505*	1,0000	-0,1099
Масса 1 000 зерен	-0,4095*	-0,1961	0,2402	-0,1099	1,0000

Примечание. уровни значимости: * — достоверно при $P < 0,05$, ** — достоверно при $P < 0,001$

в трех локациях [26]. Масса 1 000 зерен с высокой степенью достоверности отрицательно ассоциирована только с содержанием белка в зерне (табл. 2). Отрицательная корреляция между содержанием белка в зерне и массой 1 000 зерен усложняет селекцию на повышение обоих признаков одновременно. По этой причине, а также вследствие сложной полигенной природы признака и его изменчивости под действием внешних факторов, достичь существенного повышения содержания белка в зерне пшеницы — непростая задача. Несмотря на то, что большинство сородичей пшеницы уступали сортам по массе 1 000 зерен, линии, полученные с их участием, характеризовались высокими значениями по данному признаку. Кроме того, выделены линии с чужеродным генетическим материалом, которые наряду с высокой массой 1 000 зерен имеют отличные показатели и по другим признакам качества зерна: линии 190-4/1, 195-3, 196-1, 226-7, 7, 19, 25-2, 15-7-1, 2-7.

Заклучение

Оценка различий качественных показателей зерна (среднее за пять лет) между группами (сорта, образцы видов рода *Triticum* и интрогрессивные линии) на основании дисперсионного анализа и теста множественных сравнений Тьюки показала, что сородичи пшеницы значимо превосходили сорта мягкой пшеницы по содержанию белка и клейковины в зерне, качеству клейковины. Самые высокие значения по содержанию белка в зерне выявлены для образцов дикорастущей и культурной полбы — *T. dicoccoides* (23,8%), *T. dicocum* к-45926 (23,54%), *T. dicoccoides* к-5199 (23,1%); по накоплению клейковины — *T. kiharae* (46,43%); по качеству клейковины — *T. dicocum* к-45926 (75,6 усл. ед. ИДК) и *T. kiharae* (77,7 усл. ед. ИДК). Масса 1 000 зерен, напротив, была достоверно выше в группе сортов. Однако образец *T. kiharae* (44,8 г) по данному признаку превышал не только других сородичей пшеницы (35,6–38,3 г), но и сорта (35,5–44,3 г). В группе интрогрессивных линий содержание белка и клейковины, ИДК, стекловидность, масса 1 000 зерен в среднем за весь период наблюдений составили соответственно 19,11%; 37,20%; 82,67 усл. ед.; 58,55%; 41,20 г, что ближе к значениям сортов.

Установлено статистически значимое влияние генотипа, условий года и их взаимодействия на изменчивость всех изученных признаков ($P < 0,01$). Показано преобладание роли генотипа в вариации содержания белка, клейковины и массы 1 000 зерен, условий года выращивания — качества клейковины, а генотип-средовых взаимодействий — стекловидности. Выделены линии 190-4/1, 195-3, 196-1, 226-7, 7, 19, 25-2, 15-7-1, 2-7 со стабильно высокими показателями по большинству изученных признаков качества зерна, представляющие интерес для селекции мягкой пшеницы. Линии 15-7-1 и 19 переданы для научных исследований, в том числе включения в селекционный процесс в Научно-практический центр НАН Беларуси по земледелию (акт о передаче от 15 октября 2019 г.), во Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н. И. Вавилова (договор № 2 от 21 ноября 2022 г.) и в Институт ботаники, физиологии и генетики растений Национальной академии наук Таджикистана (договор № 1 от 31 января 2023 г.).

Список использованных источников

1. Малкандуев, Х. А. Понятие и требования к качеству зерна пшеницы / Х. А. Малкандуев, Р. И. Шамурзаев, А. Х. Малкандуева // Известия Кабардино-Балкарского научного центра РАН. – 2022. – № 6 (110). – С. 203–216.
2. ГОСТ 9353-2016. Межгосударственный стандарт. Пшеница. Технические условия. – Москва : Стандартинформ, 2016. – 15 с.
3. Analysis of dough rheological property and gluten quality characteristics in wild emmer wheat (*Triticum dicoccoides* (Korn. ex Asch. et Graebn.) Schweinf.) / D. Zhang [et al.] // Genetic Resources and Crop Evolution. – 2016. – Vol. 63, № 4. – P. 675–683.
4. Contribution to breadmaking performance of two different HMW glutenin *1A_y* alleles expressed in hexaploid wheat / N. Roy [et al.] // Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 2021. – Vol. 69. – P. 36–44.
5. Мамонтова, Л. И. Метеорологический словарь / Л. И. Мамонтова, С. П. Хромов. – Л. : Гидрометеиздат, 1974. – 568 с.
6. Рокицкий, П. Ф. Биологическая статистика / П. Ф. Рокицкий. – М. : Высшая школа, 1973. – 320 с.

7. Protein accumulation and composition in wheat grains: effects of mineral nutrients and high temperature / F. M. Dupont [et al.] // *Eur. J. Agronomy*. – 2006. – Vol. 25. – P. 96–107.
8. Levy, A. A. Increase in grain protein percentage in high yielding common wheat breeding lines by genes from wild tetraploid wheat / A. A. Levy // *Euphytica*. – 1987. – Vol. 36, № 2. – P. 353–359.
9. Resources of high-protein genotypes in wild wheat, *Triticum dicoccoides* in Israel: Predictive method by ecology and allozyme markers / E. Nevo // *Genetica*. – 1986. – Vol. 68. – P. 215–227.
10. Levy, A. A. Location of genes for high grain protein percentage and other quantitative traits in wild wheat *Triticum turgidum* var. *dicoccoides* / A. A. Levy, M. Feldman // *Euphytica*. – 1989. – Vol. 41. – P. 113–122.
11. 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.
12. Эффекты генов *NAM-1* на содержание белка в зерне и показатели продуктивности у линий мягкой пшеницы с интрогрессиями чужеродного генетического материала в условиях Беларуси / О. А. Орловская [и др.] // *Вавиловский журнал генетики и селекции*. – 2023. – Т. 27, № 3. – С. 197–206.
13. Generation of amphidiploids from hybrids of wheat and related species from the genera *Aegilops*, *Secale*, *Thinopyrum*, and *Triticum* as a source of genetic variation for wheat improvement / Nemeth C. [et al.] // *Genome*. – 2015. – Vol. 58, № 2. – P. 71–79.
14. Ribeiro, M. One hundred years of grain omics: identifying the glutes that feed the world / M. Ribeiro, J. Miranda, G. Branlard // *Journal of Proteome Research*. – 2013. – Vol. 12, № 11. – P. 4 702–4 716.
15. Молекулярная характеристика высокомолекулярных субъединиц глютенина 1Вх6.1 и 1Бу22.1 образца *Triticum spelta* K1731 / О. А. Орловская [и др.] // *Факторы экспериментальной эволюции организмов*. – 2019. – Т. 25. – С. 147–153.
16. Characterization of high molecular weight glutenin subunits in wild emmer wheat (*Triticum dicoccoides*) / О. А. Orlovskaya [et al.] // *Cytology and Genetics*. – 2020. – Vol. 54, № 3. – P. 199–205.
17. High-molecular-weight glutenin subunit compositions in current Chinese commercial wheat cultivars and the implication on Chinese wheat breeding for quality / S. Gao [et al.] // *Cereal Chemistry*. – 2020. – Vol. 97, № 4. – P. 762–771.
18. Hernández-Estrada, Z. J. Creep recovery of wet gluten and high-molecular-weight glutenin subunit composition: relationship with viscoelasticity of dough and breadmaking quality of hard red winter wheat / Z. J. Hernández-Estrada, P. Rayas-Duarte, J. D. D. F. Cárdenas // *Cereal Chemistry*. – 2017. – Vol. 94, № 2. – P. 223–229.
19. Захаров, В. Г. Изменение качества зерна яровой мягкой пшеницы в процессе селекции / В. Г. Захаров, О. Д. Яковлева // *Зерновое хозяйство России*. – 2016. – № 4. – С. 41–45.
20. Медведев, П. В. Сравнительная оценка показателей структурно-механических свойств зерна пшеницы / П. В. Медведев, В. А. Федотов, Е. С. Лукьянова // *Новые технологии*. – 2020. – Вып. 3 (53). – С. 63–70.
21. QTL analysis of pasta quality using a composite microsatellite and SNP map of durum wheat / W. Zhang [et al.] // *Theor. Appl. Genet.* 2008. – Vol. 117, № 8. – P. 1 361–1 377.
22. Абугалиева, А. И. Биохимический состав и технологическая оценка зерна интрогрессивных форм озимой мягкой пшеницы с участием различных видов *Triticum* и *Aegilops* / А. И. Абугалиева, Т. В. Савин // *Вавиловский журнал генетики и селекции*. – 2018. – Т. 22, № 3. – С. 353–362.
23. Казаков, Е. Д. Биохимия зерна и продуктов его переработки / Е. Д. Казаков, В. Л. Кретович. – 2-е издание перераб. и дополн. – М. : «Агропромиздат», 1989. – 368 с.
24. Genome-wide association study reveals the genetic basis of five quality traits in Chinese wheat / S. Hao [et al.] // *Front. Plant Sci.* – 2022. Vol. 13. – P. 835306.
25. QTL detection of seven quality traits in wheat using two related recombinant inbred line populations / X. Sun [et al.] // *Euphytica*. – 2012. – Vol. 183, № 2. – P. 207–226.
26. Kaya, Y. Effects of genotype and environment on grain yield and quality traits in bread wheat (*T. aestivum* L.) / Y. Kaya, M. Akcura // *Food Sci. Technol.* – 2014. – Vol. 34, № 2. – P. 386–393.

O. A. Orlovskaya, L. V. Khotyleva, A. V. Kilchevsky

EFFECT OF FOREIGN GENETIC MATERIAL INTROGRESSION ON THE MAIN GRAIN QUALITY INDICES OF COMMON WHEAT

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

The main grain quality indices (the protein and gluten content, the gluten quality, vitrescence, and thousand-kernel weight) of spring common wheat varieties, the samples of tetraploid and hexaploid species of the genus *Triticum* and 32 introgressive lines obtained using them were studied. A five-year observation period revealed that, on average, wheat relatives significantly exceeded common wheat varieties in the protein and gluten content of grain and the gluten quality, but were inferior in thousand-kernel weight. In the group of introgressive lines, the protein and gluten content, the gluten deformation index, vitrescence, and thousand-kernel weight were closer to the values of the varieties. Lines with the foreign genetic material, exceeding the initial varieties according to the grain quality characteristics studied, were identified. The lines are of interest for common wheat breeding.

Keywords: wheat relatives, introgressive lines of common wheat, grain quality.

Дата поступления в редакцию: 07 февраля 2024 г.

Л. В. Можаровская¹, С. В. Пантелеев¹, О. Ю. Баранов^{1,2}

ГЕНЫ ТЕРПЕНСИНТАЗ (*TPS*) *PINUS SYLVESTRIS* L.: ИДЕНТИФИКАЦИЯ И СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АННОТАЦИЯ НА ОСНОВЕ АНАЛИЗА ТРАНСКРИПТОМНЫХ ДАННЫХ

¹Государственное научное учреждение
«Институт леса Национальной академии наук Беларуси»
Республика Беларусь, 246001, г. Гомель, ул. Пролетарская, 71
e-mail: milamozh@yandex.ru

²Отделение биологических наук НАН Беларуси
Республика Беларусь, 220072, г. Минск, пр. Независимости, 66

По результатам анализа транскриптомных данных сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) идентифицировано 55 контигов терпенсинтаз (*TPS*), представленных 1 261 EST-последовательностью. Для четырех ранее не описанных транскриптов генов *TPS* проведена аннотация и структурно-функциональный анализ. На основе гомологии транслируемых аминокислотных последовательностей с ранее охарактеризованными терпенсинтазами родов *Pinus* и *Picea* предсказана их потенциальная функция: участие в метаболизме монотерпенов — (–)- α -пинена и (+)-3-карена, и сесквитерпена — α -фарнезена. Для анализируемых последовательностей терпенсинтаз показано наличие консервативных мотивов: N-концевого RR(X8)W и Асп-насыщенного, характерного для терпенсинтаз I класса, мотива DDxxD. Проведено депонирование нуклеотидных и аминокислотных последовательностей идентифицированных терпенсинтаз *P. sylvestris* в международной базе данных NCBI GenBank.

Ключевые слова: сосна обыкновенная, *Pinus sylvestris* L., высокопроизводительное секвенирование, терпены, гены терпенсинтаз.

Введение

Терпены растений представлены широким классом природных химических веществ, включающим более 40 тыс. различных соединений. Структура соединений представлена пятиуглеродными (C_5) изопреноидными единицами изопентенилдифосфата и его изомера — диметилаллилдифосфата. В зависимости от количества содержания (C_5)-единиц выделяют: гемитерпены (C_5), монотерпены (C_{10}), сесквитерпены (C_{15}), дитерпены (C_{20}), тритерпены (C_{30}), тетратерпены (C_{40}) или поли-терпены (C_{5n}) [1, 2]. Широкое комбинаторное разнообразие терпенов ассоциировано с активностью терпенсинтаз (*TPS*) — основных ферментов биосинтеза терпенов. *TPS* катализируют сложные реакции циклизации, перегруппировки и элиминации, вызванные карбокатионами, действуют на один или несколько универсальных предшественников (включая диметилаллилдифосфат), создавая комбинаторное разнообразие терпенов [3]. Таким

образом, одна *TPS* может давать множество продуктов из-за стохастичности перегруппировки химических связей после образования необычных промежуточных карбокатионов. В зависимости от физиологического статуса и развития растений также отмечается присутствие мультисубстратных терпенов. Кроме того, предполагается, что предпочтение субстрата и профилей терпеновых продуктов может меняться в ответ на изменения окружающей среды [4].

Терпены для хвойных растений выступают в качестве первичного уровня устойчивости, участвуя в конститутивных и индуцированных защитных реакциях при проникновении насекомых-вредителей, а также патогенов [2, 5, 6]. Летучие терпены, в основном моно- и сесквитерпены, играют значительную роль во взаимодействиях растений с окружающей средой, выступая в качестве сигнальных молекул для стимуляции защитных реакций в здоровых тканях того же растения, а также в соседних

растениях, кроме того, могут выполнять функцию привлечения естественных врагов патогенов и вредителей [3–5]. Помимо химической и физической защиты, конститутивные и индуцированные терпены хвойных растений, в основном геми- и монотерпены, могут выполнять физиологическую и экологическую роль в защите от абиотических стрессов, таких как засуха, засоление, высокие и низкие температуры [6]. Ряд исследований показал, что некоторые терпены проявляют значительную антиоксидантную активность, что позволяет предположить, что они могут играть роль в предотвращении окислительного стресса, вызванного абиотическими факторами [3, 7, 8].

Широко используются терпены и их производные в химической промышленности: при производстве парфюмерии и косметических средств, ароматизаторов и пищевых добавок [9–10]. Монотерпены хвойных растений используют и в фармакологии за счет проявления антимикробной, противовирусной и противоопухолевой активности [11–12].

К настоящему времени представлены многочисленные работы по изучению TPS отдельных видов семейства Pinaceae, при этом данные об общем полном количестве генов TPS ограничены. Особенно затрудняет идентификацию TPS отсутствие прочитанных и/или аннотированных геномных данных хвойных видов. Так, наиболее охарактеризованы TPS в исследованиях Д. Э. Холла с соавторами [13], где представлено 16 различных генов *Pinus contorta* и 15 генов *Pinus banksiana*, в работе Д. М. Мартин с соавторами [14] описано девять различных TPS *Picea abies*. Для *P. sylvestris* в общедоступных данных представлена ограниченная информация о нуклеотидных или аминокислотных структурах терпенсинтаз. В международной базе нуклеотидных данных NCBI GenBank содержится информация о четырех сесквитерпенсинтазах (STPS) *P. sylvestris*, охарактеризованных в работах Д. Кепке с соавторами [15].

Исходя из этого, для более детального понимания механизмов биосинтеза терпенов необходимо проводить исследования, направленные на скрининг новых генов семейства TPS *P. sylvestris*, изучение их разнообразия и структурно-функциональной организации.

Целью нашего исследования являлся по-

иск транскриптов генов терпенсинтаз (TPS) в транскриптомах сосны обыкновенной, с их последующей структурно-функциональной аннотацией.

Материалы и методы

В исследовании использовались транскриптомы сосны обыкновенной базы данных ГНУ «Институт леса НАН Беларуси». Материалом для RNA-seq являлись ювенильные (проростки) растения и средневозрастные генеративные (40–45 лет) деревья сосны обыкновенной. Для проростков тотальную РНК выделяли из корня и гипокотыля индивидуальных растений, объединенных в пул (всего проанализировано три транскриптома, общее число растений — 49 шт.), для средневозрастных деревьев использовались ткани камбиальных зон вегетирующих побегов (проанализировано два транскриптома, число деревьев — 2 шт.), с применением набора GeneJET Plant RNA Purification Mini Kit (Thermo Fisher Scientific, США) по методике фирмы-производителя. Очистку РНК от примесей геномной ДНК выполняли с помощью DNase I, RNase-free (Thermo Fisher Scientific, США), а для ингибирования рибонуклеаз использовали RNase Inhibitor (Thermo Fisher Scientific, США). Для реакции обратной транскрипции матричной РНК с получением двухцепочечной кДНК использовали набор Maxima H Minus Double-Stranded cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific, США).

Создание фрагментированных библиотек кДНК для секвенирования (размер фрагмента ≈ 200 п. н.) проводили с использованием набора Ion Plus Fragment Library Kit (Thermo Fisher Scientific, США). Эмульсионную ПЦР выполняли с применением набора Ion PGM Template OT2 200 Kit (Thermo Fisher Scientific, США) согласно инструкции компании-производителя в планшетном амплификаторе Ion One Touch 2 System (Thermo Fisher Scientific, США). Этап обогащения микросфер производился с использованием автоматической пробоподготовки Ion One Touch ES с применением наборов Ion PGM Template OT2 Solutions 200 Kit и Ion PGM Enrichment Beads (Thermo Fisher Scientific, США). Реакцию секвенирования выполняли на базе геномного анализатора Ion PGM System (Thermo Fisher

Scientific, США) с применением набора Ion PGM Sequencing 200 Kit v2 и полупроводникового микрочипа Ion 314 Chip v2 (Thermo Fisher Scientific, США). Первоначальную обработку данных, поступающих от геномного анализатора, осуществляли в автоматическом режиме при помощи программного обеспечения IonTorrent Suite v. 4.0 (Thermo Fisher Scientific, США). Окончательную обработку информации и сборку транскриптов генов проводили с использованием программного обеспечения UGENE (UniPro, Россия).

Структурно-функциональная аннотация транскриптомов проводилась согласно анализу структурного сходства последовательностей (ISS-подход) в базе данных нуклеотидных последовательностей и консервативных доменов NCBI CDD. Множественное выравнивание нуклеотидных последовательностей транскриптов проводили в программе MEGA 11. Трансляцию нуклеотидных последовательностей с последующим множественным выравниванием проводили с использованием программного пакета CLC Sequence Viewer 6.3 (Qiagen, США) и онлайн ресурса NCBI ORF finder. Филогенетический анализ проводился в программе MEGA11 [16]. Статистическая поддержка кластеризации оценивалась с помощью бутстреп-анализа с использованием 1 000 итераций.

Результаты и обсуждение

Поиск транскриптов *TPS*-локусов осуществлялся на основании наличия консервативных доменов: PF01397, PF03936 и cd00684. Всего для исследуемых транскриптомов *P. sylvestris* идентифицировано 55 контигов *TPS*, представленных 1 261 EST-последовательностью. На основе функциональной характеристики и анализа сходства нуклеотидных последовательностей в GenBank NCBI нами были идентифицированы *TPS*-локусы кодирующие монотерпенсинтазы [(+)-3-карен-синтаза, (-)- α -пинен-синтаза, (+)- α -пинен-синтаза], сесквитерпенсинтазы (α -фарнезен-синтаза, гермакрадиен-4-ол-синтаза) и дитерпенсинтазу (левопимарадиен/абиетадиен-синтаза). Из общего спектра *TPS* контигов идентифицировано четыре транскрипта, содержащих полную открытую рамку считывания (ORF): № 708, 1 282, 2 355 и 2 458.

Сравнительное изучение нуклеотидных последовательностей транскриптов сосны обыкновенной в базе данных NCBI позволило идентифицировать наиболее схожие им по нуклеотидной структуре транскрипты. Для контига № 708 наиболее близкой была нуклеотидная последовательность мРНК гена (-)- α -пинен-синтазы *TPS(-)apin1 P. contorta* (учетная запись NCBI GenBank JQ240303.1, уровень сходства 95%); для контигов № 1 282 и 2 458 — мРНК гена (+)-3-карен-синтазы *TPS(+)-3car1 P. banksiana* (учетная запись NCBI GenBank JQ240305.1, уровень сходства 96 и 98%, соответственно); контиг № 2 355 был наиболее схож с мРНК гена (E,E)- α -фарнезен-синтазы/(E)- β -оцимен-синтазы гибрида рода елей *Picea* — *P. engelmannii* \times *P. glauca* (учетная запись NCBI GenBank HQ426157.1, уровень сходства 90%), а среди рода *Pinus* наиболее близким транскриптом для контига № 2 355 явилась мРНК гена α -фарнезен-синтазы *Pinus taeda* (учетная запись NCBI GenBank AF543528.1, уровень сходства 79%).

На основе анализа в онлайн ресурсе NCBI ORF finder установлены открытые рамки считывания (ORF) для анализируемых транскриптов генов *TPS*. Их длина для № 708 составила 1 884 п. о, кодирующих 627 аминокислот; для № 1 282 — 1 773 п. о, кодирующих 590 аминокислот; для № 2 355 — 1 716 п. о, кодирующих 571 аминокислоту; и для № 2458 — 1 881 п. о, кодирующих 626 аминокислот. С использованием программы Protein BLAST был проведен поиск гомологов транслируемых аминокислотных последовательностей идентифицированных терпенсинтаз в базе данных GenBank NCBI, с последующей оценкой степени их сходства. Для контига № 708 сходство аминокислотной последовательности транслируемого региона составило 90% с наиболее близкой аминокислотной последовательностью (-)- α -пинен-синтазы *P. contorta* (учетная запись NCBI GenBank: AFU73855.1 — транслируемая последовательность JQ240303.1; UniProtKB/Swiss-Prot: R9QMR3.1). Аминокислотным последовательностям транслируемых участков контигов № 1 282 и 2 458 наиболее близкими по структуре явились последовательности (+)-3-карен-синтазы: *P. contorta* (учетная запись NCBI GenBank: AFU73859.1 — транс-

лируемая последовательность JQ240307.1; UniProtKB/Swiss-Prot: R9QMW8.1, сходство 96%) и *P. banksiana* (учетная запись NCBI GenBank: AFU73857.1 — транслируемая последовательность JQ240305.1; UniProtKB/Swiss-Prot: R9QMW4.1, сходство 98%), соответственно. Транслируемая аминокислотная последовательность контига № 2 355 наибольшую схожесть имела с (E,E)- α -фарнезен-синтазой/(E)- β -оцимен-синтазой гибрида рода *Picea* — *P. engelmannii* \times *P. glauca* (учетная запись NCBI GenBank: ADZ45514.1 — транслируемая последовательность HQ426157.1; UniProtKB/Swiss-Prot: F2XF99.1, уровень сходства 87%).

Для четырех идентифицированных аминокислотных последовательностей терпенсинтаз *P. sylvestris* (контиги № 708, 1 282, 2 355 и 2 458) проводился кластерный анализ с использованием 45 ранее известных аминокислотных последовательностей для видов родов *Pinus* и *Picea* из базы данных NCBI GenBank со следующими учетными номерами: *P. banksiana* (AFU73842.1–AFU73844.1, AFU73848.1–AFU73850.1, AFU73854.1, AFU73856.1–AFU73858.1, AFU73860.1); *P. contorta* (AFU73845.1–AFU73847.1, AFU73851.1–AFU73853.1, AFU73855.1, AFU73859.1, AFU73861.1); *Pinus greggii* (AFJ73549.1); *Pinus kesiya* var. *langbianensis* (AIY22674.1, AQZ36562.1); *Pinus massoniana* (AGW25369.1, AIL88641.1, QDZ38469.1, QLH02025.1, QMU23999.1); *Pinus nigra* subsp. *laricio putative* (UMW72395.1); *Pinus pseudostrobus* (AFJ73572.1); *Pinus pseudostrobus* var. *estevezii* (AFJ73569.1); *Pinus sabiniana* (AEB53064.1); *P. sylvestris* (ABV44452.1–ABV44454.1, ADH29869.1); *Pinus tabuliformis* (ABY65904.1); *Pinus taeda* (AAO61225.1, AAO61227.1, AAO61228.1, Q84KL5.1); *Pinus teocote* (AFJ73576.1); *P. abies* (AAS47697.1); *P. engelmannii* \times *P. glauca* (ADZ45514.1); *Picea sitchensis* (ADU85928.1). В качестве внешней группы использовалась аминокислотная последовательность энт-каурен синтазы представителя мохообразных растений — *Physcomitrium patens* (учетная запись NCBI GenBank: VAF61135.1 гена *PpCPS/KS*). Кластерный анализ проводился с использованием метода ближайшего соседа (neighbor-joining, NJ) и бутстреп-теста на основе 1 000

итераций. Всего в анализ были включены 924 аминокислотных сайта 50 аминокислотных последовательностей. На рисунке 1 представлены результаты кластерного анализа.

Как видно из структуры дендрограммы (рис. 1) исследуемые контиги *P. sylvestris* относятся к трем кладам при максимальном уровне бутстреп-поддержки в 100%. Так, клада, обозначенная нами как *TPS(-)apin*, включает восемь аминокислотных последовательностей, функционально охарактеризованных как (-)- α -пинен-синтазы рода *Pinus* (QDZ38469.1, QLH02025.1, QMU23999.1, AQZ36562.1, AFU73855.1, AFU73856.1, AAO61225.1, ABY65904.1) и идентифицированного нами контига № 708. Транслируемая аминокислотная последовательность контига № 2 355 кластеризуется вместе с представителями родов *Pinus* и *Picea*, отнесенных авторами к α -фарнезен-синтазам (*P. taeda*, Q84KL5.1), (E,E)- α -фарнезен-синтазам (*P. abies*, AAS47697.1) или (E,E)- α -фарнезен-синтаза/(E)- β -оцимен-синтаза (*P. engelmannii* \times *P. glauca*, ADZ45514.1), и формируют общую кладу, отмеченную как *TPS-afarn*. Две аминокислотные последовательности контигов № 1 282 и 2 458, относятся к различным ветвям одной общей клады, обозначенной нами как *TPS-(+)car*, совместно с пятью (+)-3-каурен-синтазами родов *Pinus* (AFU73857.1–AFU73859.1, UMW72395.1) и *Picea* (ADU85928.1).

Полученные результаты кластеризации позволяют разделить идентифицированные нами транскрипты генов терпенсинтаз *P. sylvestris* согласно гомологии их структур с ранее известными терпенсинтазами. Нуклеотидные и аминокислотные последовательности новых терпенсинтаз *P. sylvestris* депонированы нами в международную базу NCBI GenBank под следующими учетными записями: контиг № 708, (-)- α -пинен-синтаза — PP210211.1 и WVH32569.1; № 1 282, (+)-3-каурен-синтаза — PP210213.1 и WVH32571.1; № 2 355, α -фарнезен-синтаза — PP210210.1 и WVH32568.1; № 2 458, (+)-3-каурен-синтаза — PP210212.1 и WVH32570.1.

Проведен анализ множественного выравнивания аминокислотных последовательностей терпенсинтаз, составляющие клады дендрограммы: *TPS(-)apin*, *TPS-afarn* и *TPS-(+)car*. Количество аминокислот в исследуемых пепти-

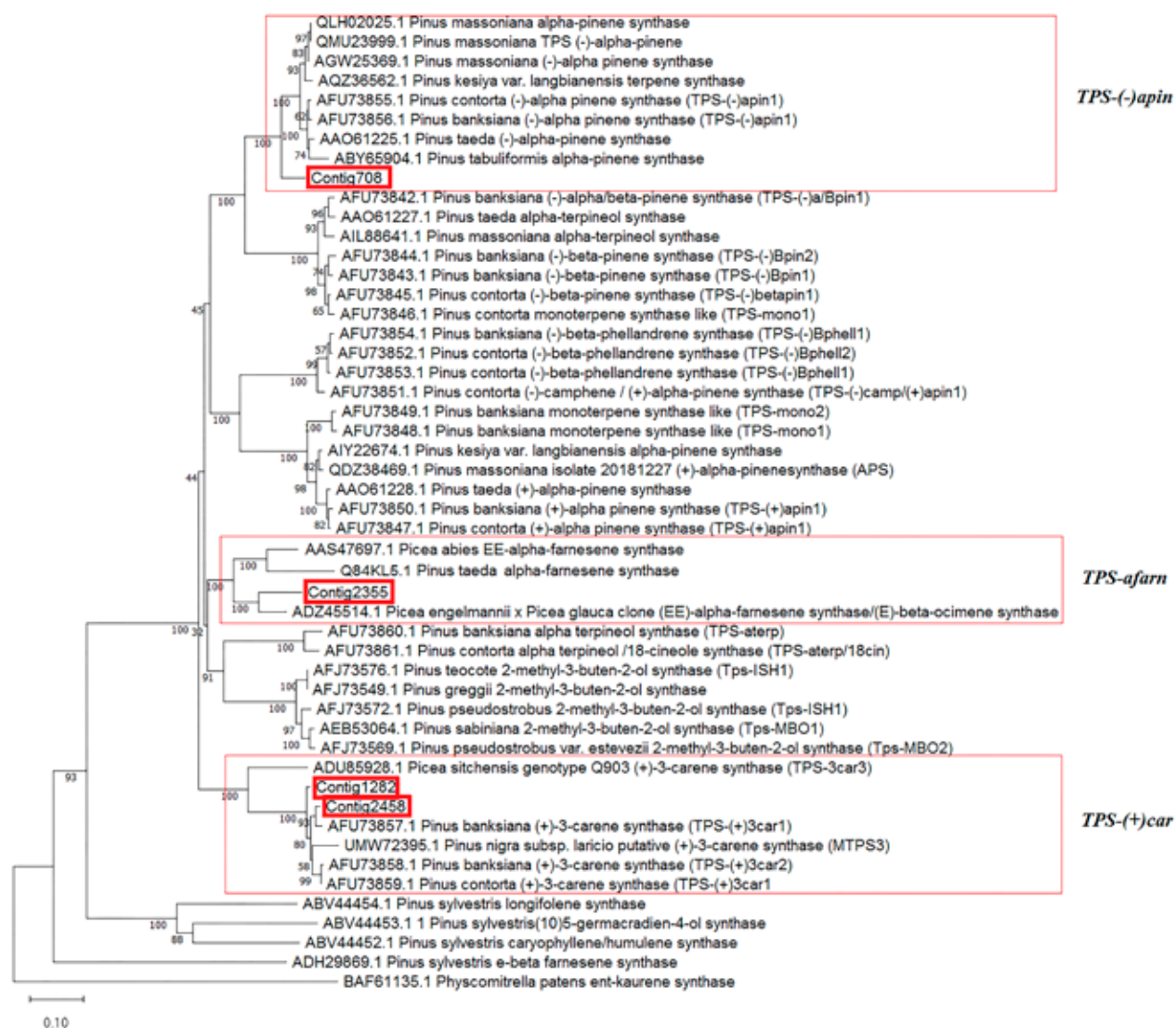


Рис. 1. Дендрограмма сходства исследуемых аминокислотных последовательностей TPS

дах варьировало, как и присутствие консервативных сайтов: последовательности клады *TPS(-)apin* характеризуются длиной от 624 до 629 а. о. и содержат 383 консервативные аминокислоты; *TPS-afarn* — 574–587 а. о., из них 395 являются консервативными; *TPS(+)-car* клада включает (+)-3-карен-синтазы длиной от 589 (контиг № 1 282, WVN32571.1, содержащий делецию в 37 а. о. на N-конце) до 627 а. о., включающих 444 консервативные аминокислоты. Характерной особенностью анализируемых пептидов являлось наличие консервативных мотивов: N-концевого RR(X8)W (рис. 2), предположительно необходимого для катализа циклизации монотерпенов, и Асп-насыщенного мотива DDxxD, консервативного для терпенсинтаз I класса (рис. 3), участвующего

в координации связывания субстрата посредством образования солевых мостиков двухвалентных катионов [3, 17].

Исходя из полученных данных, для аминокислотных последовательностей идентифицированных транскриптов генов терпенсинтаз (*TPS*) *P. sylvestris* на основе гомологии с ранее функционально охарактеризованными ортологичными терпенсинтазами родов *Pinus* и *Piceae* предсказана их потенциальная функция. Уровень сходства транслируемых аминокислотных последовательностей *TPS* *P. sylvestris* с наиболее близкими ортологами хвойных видов варьировал от 87 до 98%.

Заключение

Исследования, направленные на изучение

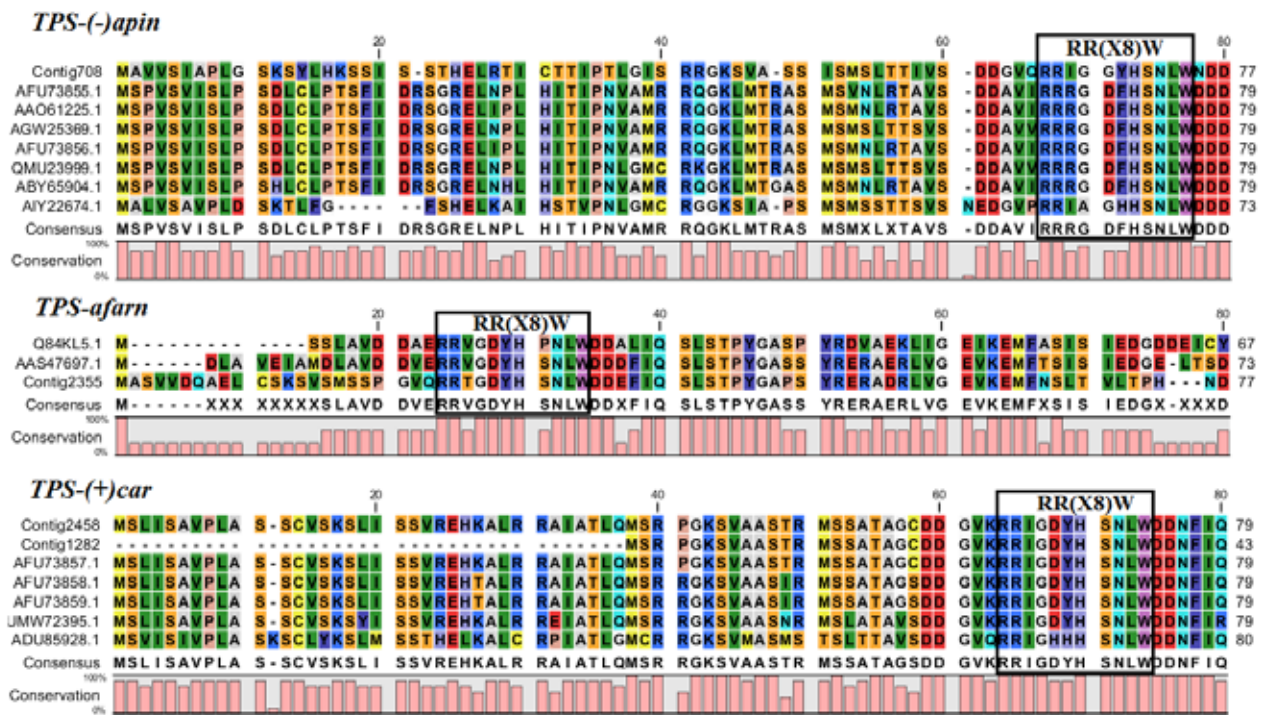


Рис. 2. Фрагмент множественного выравнивания аминокислотных последовательностей терпенсинтаз, составляющих клады дендрограммы: *TPS(-)apin*, *TPS-afarn*, *TPS(+)-car*. Рамкой отмечен N-концевой мотив RR(X8)W

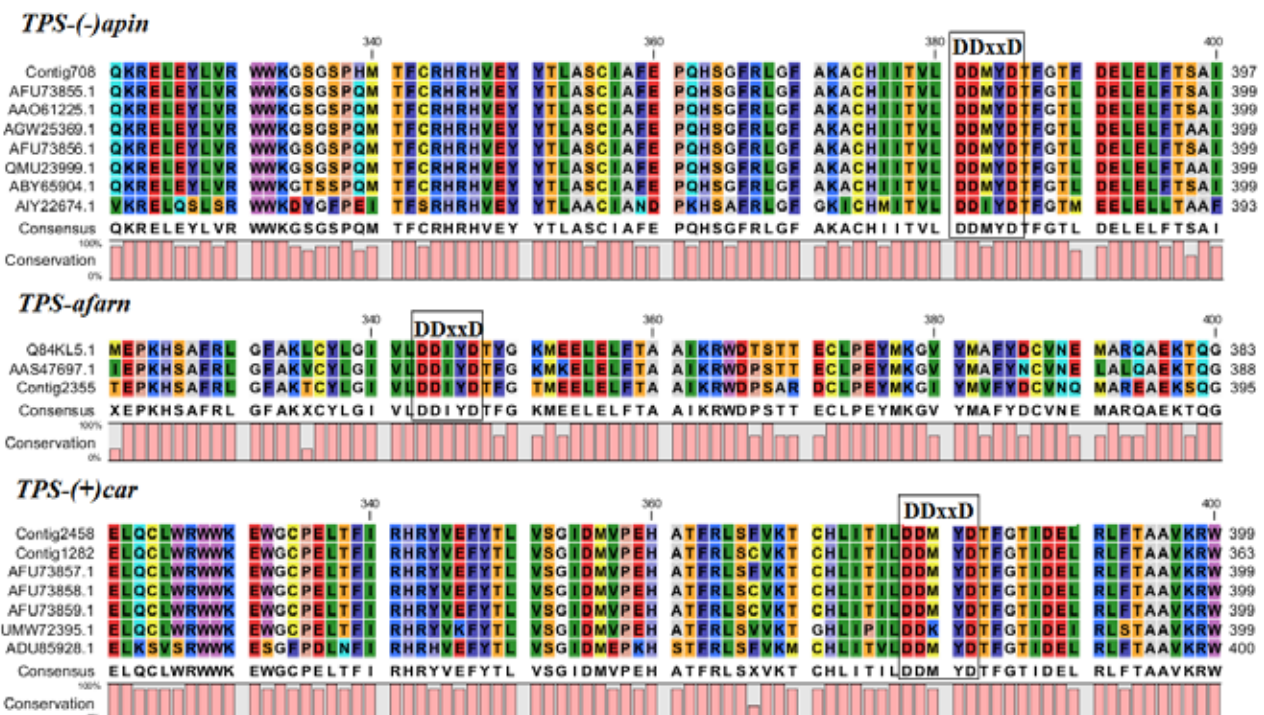


Рис. 3. Фрагмент множественного выравнивания аминокислотных последовательностей терпенсинтаз, составляющих клады дендрограммы: *TPS(-)apin*, *TPS-afarn*, *TPS(+)-car*. Рамкой отмечен мотив DDxxD

молекулярных механизмов, регулирующих синтез терпенов хвойных пород, являются актуальными в связи с широким спектром вы-

полняемых ими защитных функций, а также их применения в биотехнологической отрасли и химической промышленности. В результате

анализа транскриптомных данных *P. sylvestris* нами идентифицированы транскрипты четырех ранее не описанных генов терпенсинтаз. На основе структурно-функциональной аннотации, а также гомологии с ранее охарактеризованными терпенсинтазами родов *Pinus* и *Picea*, предсказана их потенциальная функция. Идентифицированные гены *TPS P. sylvestris*, предположительно, участвуют в метаболизме монотерпенов — (–)- α -пинена и (+)-3-карена, и сесквитерпена — α -фарнезена. Их нуклеотидные и аминокислотные последовательности депонированы в NCBI GenBank под номерами: PP210210.1–PP210213.1, WVH32568.1–WVH32571.1.

Список использованных источников

1. Tholl, D. Biosynthesis and biological functions of terpenoids in plants / D. Tholl // *Biotechnology of isoprenoids*. – 2015. – P. 63–106.
2. Terpenes and terpenoids in plants: Interactions with environment and insects / D. A. T. Boncan [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2020. – Vol. 21, № 19. – P. 7 382.
3. Monoterpene Synthase Genes and Monoterpene Profiles in *Pinus nigra* subsp. *laricio* / E. Alicandri [et al.] // *Plants*. – 2022. – Vol. 11, № 3. – P. 449.
4. Zulak K. G., Bohlmann J. Terpenoid biosynthesis and specialized vascular cells of conifer defense / K. G. Zulak, J. Bohlmann // *Journal of Integrative Plant Biology*. – 2010. – Vol. 52, № 1. – P. 86–97.
5. Celedon, J. M., Bohlmann, J. Oleoresin defenses in conifers: Chemical diversity, terpene synthases and limitations of oleoresin defense under climate change / J. M. Celedon, J. Bohlmann // *New Phytologist*. – 2019. – Vol. 224. – P. 1 444–1 463.
6. Kopaczynk, J. M. The variability of terpenes in conifers under developmental and environmental stimuli / J. M. Kopaczynk, J. Warguła, T. Jelonek // *Environmental and Experimental Botany*. – 2020. – P. 104 197.
7. The anticancer, antioxidant and antimicrobial properties of the sesquiterpene β -caryophyllene from the essential oil of *Aquilaria crassna* // S. S. Dahham [et al.] // *Molecules*. – 2015. – Vol. 20. – P. 11 808–11 829.
8. *In vitro* neuroprotective potential of the monoterpenes α -pinene and 1, 8-cineole against H₂O₂-induced oxidative stress in PC12 cells / M. Porres-Martínez [et al.] // *Zeitschrift für Naturforschung C*. – 2016. – Vol. 71. – P. 191–199.
9. Volatile terpenoids: Multiple functions, biosynthesis, modulation and manipulation by genetic engineering / F. Abbas [et al.] // *Planta*. – 2017. – Vol. 246. – P. 803–816.
10. Isoprenoid drugs, biofuels, and chemicals — Artemisinin, farnesene, and beyond / K. W. George [et al.] // *Biotechnology of Isoprenoids* – 2015. – P. 355–390.
11. Antitumor activity of monoterpenes found in essential oils / M. V. Sobral [et al.] // *The Scientific World Journal*. – 2014. – P. 953 451.
12. Растительные терпеноиды, как основа создания новых противовирусных препаратов / А. С. Турмагамбетова [и др.] // *Новости науки Казахстана*. – 2018. – № 3. – С. 57–65.
13. Transcriptome resources and functional characterization of monoterpene synthases for two host species of the mountain pine beetle, lodgepole pine (*Pinus contorta*) and jack pine (*Pinus banksiana*) / D. E. Hall [et al.] // *BMC Plant Biology*. – 2013. – Vol. 13. – P. 1–14.
14. Martin, D. M. Functional characterization of nine Norway spruce TPS genes and evolution of gymnosperm terpene synthases of the TPS-d subfamily / D. M. Martin, J. Fäldt, J. Bohlmann // *Plant physiology*. – 2004. – Vol. 135, № 4. – P. 1 908–1 927.
15. Species-specific responses of pine sesquiterpene synthases to sawfly oviposition / D. Köpke [et al.] // *Phytochemistry*. – 2010. – Vol. 71, № 8–9. – P. 909–917.
16. Tamura, K. MEGA 11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11 / K. Tamura, G. Stecher, S. Kumar // *Molecular Biology and Evolution*. – Vol. 38, № 7. – P. 3 022–3 027.
17. On the evolution and functional diversity of terpene synthases in the *Pinus* species: A Review / E. Alicandri [et al.] // *Journal of Molecular Evolution*. – 2020. – Vol. 88. – P. 253–283.

L. V. Mozharovskaya¹, S. V. Pantelev¹, O. Yu. Baranov^{1,2}

***PINUS SYLVESTRIS* L. TERPENE SYNTHASE (*TPS*) GENES:
IDENTIFICATION, STRUCTURAL AND FUNCTIONAL ANNOTATION
BASED ON THE TRANSCRIPTOMIC DATA ANALYSIS**

¹State Scientific Institution

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

71 Proletarskaya St., 246001 Gomel, the Republic of Belarus

e-mail: milamozh@yandex.ru

²Department of Biological Sciences of the National Academy of Sciences of Belarus

66 Nezavisimosti Ave., 220072 Minsk, the Republic of Belarus

As a result of the transcriptomic data analysis of *Pinus sylvestris*, 55 terpene synthase contigs (*TPS*) represented by 1261 EST sequences were identified. Annotation and structural-functional analysis were carried out for four previously undescribed *TPS* gene transcripts. Based on the homology of the translated amino acid sequences with previously characterized terpene synthases of the genera *Pinus* and *Picea*, their potential function was predicted: participation in the metabolism of monoterpenes — (–)- α -pinene and (+)-3-carene, and sesquiterpene — α -farnesene. The analyzed terpene synthase sequences show the presence of conserved motifs: the N-terminal RR(X8)W and the Asp-saturated DDxxD motif, characteristic of class I terpene synthases. The nucleotide and amino acid sequences of the identified *P. sylvestris* terpene synthases were deposited with the International Database NCBI GenBank.

Keywords: Scotch pine, *Pinus sylvestris* L., next-generation sequencing, terpenesterpene synthase genes.

Дата поступления в редакцию: 06 февраля 2024 г.

А. Н. Заинчковская, Е. А. Фомина, О. Ю. Урбанович

ИЗУЧЕНИЕ УРОВНЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ *HvGT-8*, *HvGT-10* И *HvGT-42* У СОРТОВ ОЗИМОГО ЯЧМЕНЯ В МОДЕЛИРУЕМЫХ УСЛОВИЯХ ХОЛОДОВОГО СТРЕССА

Государственное научное учреждение
«Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси»
Республика Беларусь, 220141, г. Минск, ул. Ф. Скорины, 34
e-mail: O.Urbnovich@igc.by

Исследован уровень экспрессии генов *HvGT-8*, *HvGT-10* и *HvGT-42*, кодирующих белки семейства Trihelix, в сортах озимого ячменя Тереза и Нектария, обладающих различным уровнем морозостойкости, в моделируемых условиях холодного стресса. Показано статистически значимое снижение уровня экспрессии гена *HvGT-8* в указанных сортах на каждом из моделируемых этапов холодного стресса, за исключением сорта Нектария при наступлении условий +4 °С. При изучении уровня экспрессии гена *HvGT-10* для сорта Тереза было показано статистически значимое изменение уровня его экспрессии от снижения до 0,78 при +2 °С до увеличения в 1,40 раза при +2/-2 °С. Для сорта Нектария наблюдались статистически значимые колебания уровня экспрессии гена *HvGT-10* от снижения до 0,70 при +4 °С до увеличения в 1,56 раза при +2 °С. Исследование уровня экспрессии гена *HvGT-42* выявило статистически значимое увеличение уровня его экспрессии для сорта Нектария через 4 ч после наступления условий -2 °С. Экспрессия данного гена возрастала также и у сорта Тереза в 1,46 и 1,51 раза при наступлении условий +2 и -4 °С соответственно. Однако при наступлении условий +4, -2 и +2/-2 °С у данного сорта наблюдалось уменьшение показателя уровня экспрессии указанного гена.

Ключевые слова: озимый ячмень, морозостойкость, семейство генов Trihelix, уровень экспрессии генов, транскрипционные факторы.

Введение

Ячмень — одна из важнейших злаковых культур в мире. Растения данного злака легко адаптируются к широкому спектру условий выращивания, а также имеют высокий потенциал продуктивности. Из-за высокого геномного разнообразия и уникальных морфологических свойств ячмень широко используется как модель для изучения различных видов абиотического стресса [1, 2].

В Республике Беларусь ячмень является основной злаковой культурой, используемой для включения в рацион сельскохозяйственных животных. По данным Национального статистического комитета (на июль 2023 г.), площади под посевами ячменя в стране последние годы занимают около 391,5 тыс. га, что составляет 15,5% от всех площадей, занятых под зерновые и зернобобовые, и 6,8% от всех посевных площадей в стране. Около 60 тыс. га из них занимает озимый ячмень. В Государственный реестр сортов, допущен-

ных к использованию по состоянию на 2023 г., включено 13 сортов озимого ячменя [3].

Холод является одним из наиболее важных абиотических стрессов, которые ограничивают производство и снижают урожайность сельскохозяйственных культур в зонах умеренного климата, к которому относится и Республика Беларусь. Поэтому важной областью исследований, в том числе и с экономической точки зрения, является изучение механизмов акклиматизации к холоду и развития морозостойкости, поскольку озимые зерновые должны выдерживать отрицательные температуры зимой [4]. Молекулярное исследование этого сложного мультигенного признака может помочь в ближайшем будущем вывести сорта озимых зерновых культур и ячменя в частности с высоким уровнем морозостойкости, что является одной из важнейших задач, стоящих перед селекционерами в настоящее время.

Рост и продуктивность растений находятся под постоянной угрозой из-за изменений окру-

жающей среды в виде биотических и абиотических стрессов. Транскрипционные факторы, играющие очень важную роль в передаче сигнала у растений в ответ на стресс, связываются со специфическими областями промотора гена и цис-действующими элементами для активации или ингибирования транскрипции [5]. У растений обнаружено более 60 семейств транскрипционных факторов, многие из которых тщательно изучены с целью оценки их физиологических функций. Одними из первых транскрипционных факторов, обнаруженных у растений, которые принимают участие в разнообразных процессах развития и реакциях на абиотический стресс, являются белки семейства Trihelix [6]. На данный момент эти ДНК-связывающие белки обнаружены только у растений [7].

Гены, кодирующие белки данного семейства, в основном изучались у двудольных растений, таких как арабидопсис, томат и хризантема, тогда как на однодольных растениях исследования практически не проводились [8]. Это семейство, известное также как GT факторы, было названо в соответствии с его консервативным ДНК-связывающим доменом, который специфически связывается с мотивом GT, светочувствительным регуляторным элементом ДНК. Структура ДНК-связывающего домена Trihelix включает три α -спирали, разделенные двумя петлями, и по последовательности аналогична ДНК-связывающим доменам Mub растений. Аминокислотные последовательности этих функциональных доменов демонстрируют высокую степень консервативности, обычно со сходством либо на N-конце, либо на C-конце. В соответствии с изменениями в их альфа-спиральном домене семейство Trihelix

было разделено на пять подсемейств, обозначаемых соответственно как I (или SH4), II (или GT-1), III (или GT γ), IV (или SIP1), и V (или GT-2) [5, 9, 10].

В последние годы было показано, что белки семейства Trihelix участвуют в реакции растений на различные виды абиотического стресса (засуха, засоление, в том числе и холод) [6]. Таким образом, изучение семейства данных генов, в ответ на абиотический стресс, является актуальным вопросом в настоящее время. В связи с этим целью нашего исследования было изучение уровня экспрессии генов семейства Trihelix (*HvGT-8*, *HvGT-10* и *HvGT-42*) у сортов озимого ячменя Тереза и Нектария, обладающих различным уровнем морозостойкости, в моделируемых условиях холодного стресса.

Материалы и методы

Растительный материал и условия выращивания растений

Объектом исследования послужили сорта озимого ячменя французской селекции Тереза и Нектария, отличающиеся по уровню морозостойкости. Так, сорт Тереза, согласно полевой оценке, обладает высоким уровнем морозостойкости [11], Нектария же — низким [12]. Данные образцы были переданы отделом ячменя РУП «Научно-практический центр НАН Беларуси по земледелию» (г. Жодино). Растения высаживались в питательный торфяной грунт «ДВИНА» (ПУ «Витебскторф») в климатической камере Pol-Еко-Аparatura КК1200Fit при относительной влажности 80% и интенсивности освещения 15 000 лк. При выращивании растений был использован режим, представленный в таблице 1.

Таблица 1

Условия выращивания озимого ячменя, моделирующие прохождение заморозков

Номер этапа	Условия	Количество дней от посадки семян
1	16/10 °C (12 ч день/12 ч ночь)	14
2	10/4 °C (12 ч день/12 ч ночь)	38
3	4 °C (48 ч ночь)	44
4	2 °C (60 ч ночь), затем –2 °C (12 ч ночь)	48
5	5 дней 2 °C (12 ч)/–2 °C (12 ч)	55
6	–4 °C (12 ч)	56

Примечание. полужирным шрифтом выделены стадии, на которых проходило выделение РНК

Получение препаратов РНК

Выделение РНК из узлов кущения растений на различных стадиях роста было осуществлено при помощи реагента для выделения суммарной РНК ExtractRNA (Евроген, Россия) согласно протоколу производителя.

Получение препаратов кДНК

Перед синтезом кДНК полученные препараты РНК были обработаны ДНКазой (DNase I, RNase-free (Thermo scientific, ЕС)) по предложенному производителем протоколу. Синтез кДНК проводили с использованием ArtMMLV Total (ООО «АртБиоТех», Беларусь) согласно протоколу, предложенному производителем.

Проведение ПЦР в режиме реального времени

Для проведения ПЦР в режиме реального времени использовали смесь ArtMix Color (ООО «АртБиоТех», Беларусь) согласно протоколу производителя. При постановке реакции для каждого сорта использовали по три биологические повторности, каждая из которых включала три растения. При этом каждая биологическая повторность также была представлена тремя аналитическими повторностями. Для проведения амплификации была использована следующая программа:

1 цикл продолжительностью 3 мин при 95 °С; 38 циклов, включающих в себя: 15 сек при 95 °С, 20 сек при температуре отжига, указанной в таблице 2, 30 сек при 72 °С.

Последовательности праймеров отдельных *HvGT* генов и референсного гена, кодирующего первичную последовательность актина, приведена в таблице 2.

Статистическая обработка данных

Количество целевого транскрипта рассчитывали относительно числа копий мРНК референсного гена, кодирующего первичную структуру актина, который стабильно экспрессируется в клетках вне зависимости от внешних воздействий на организм. Кратность изменения уровня экспрессии определенного *HvGT* гена в исследуемых условиях относительно нормальных условий проводили по методу $2^{-\Delta\Delta C_T}$, допуская, что уровень эффективности амплификации всех праймеров равен 100%, где

$-\Delta\Delta C_T$ — изменение уровня экспрессии определенного *HvGT* гена в исследуемых условиях относительно нормальных условий рассчитывали по формуле 1:

$$-\Delta\Delta C_T = \Delta C_{T(\text{тест})} - \Delta C_{T(\text{н. у.})}, \text{ где} \quad (1)$$

$\Delta C_{T(\text{тест})}$ — изменение уровня экспрессии определенного *HvGT* гена относительно референсного гена актина в исследуемых условиях;

$\Delta C_{T(\text{н. у.})}$ — изменение уровня экспрессии определенного *HvGT* гена относительно референсного гена актина в нормальных условиях.

$\Delta C_{T(\text{тест})}$ и $\Delta C_{T(\text{н. у.})}$ рассчитывали по формулам 2, 3:

$$\Delta C_{T(\text{тест})} = C_{T(\text{HvGT, тест})} - C_{T(\text{ACT, тест})} \quad (2)$$

$$\Delta C_{T(\text{н. у.})} = C_{T(\text{HvGT, н. у.})} - C_{T(\text{ACT, н. у.})}, \text{ где} \quad (3)$$

Таблица 2

Нуклеотидные последовательности праймеров, используемых для анализа экспрессии отдельных *HvGT* генов

Название гена	Последовательность праймера, 5' → 3'	Длина ПЦР продукта, п. н.	Tm, °C
<i>HvGT-8</i>	F - CTTCGCCCCGCAATTATCAGT R - CTCGTTGTCATCGTCTCTTCC	107	60
<i>HvGT-10</i>	F - TGTGAGGGAGCTGAACGAGC R - GTTTGGCCTCTGGAACGTATC	147	62
<i>HvGT-42</i>	F - TGCAGAAAAC TCAAGGACA R - TCTCATGCCATAGCATATCGA	94	60
<i>Hv_ACT</i>	F - GCGCAGTCCAAGAGAGGTATC R - CAACACAGGGTGCTCCTCGGG	142	56–64

$C_{T(HvGT, \text{тест})}$ — пороговый цикл для определенного *HvGT* гена в исследуемых условиях;

$C_{T(ACT, \text{тест})}$ — пороговый цикл для референсного гена актина в исследуемых условиях;

$C_{T(HvGT, \text{н. у.})}$ — пороговый цикл для определенного *HvGT* гена в нормальных условиях;

$C_{T(ACT, \text{н. у.})}$ — пороговый цикл для референсного гена актина в нормальных условиях [13, 14].

Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета программ Microsoft Excel (Microsoft Corporation, USA). В частности, сравнение выборок с целью выявления статистически значимых отличий между ними проводилось при помощи однофакторного дисперсионного анализа.

Результаты и обсуждение

Ранние исследования арабидопсиса показывают, что гены семейства Trihelix играют множество ролей в различных процессах развития растения [15]. В последние годы данные показали, что белки указанного семейства транскрипционных факторов участвуют в реакции растений на различные виды абиотического стресса, в том числе и холодого [16–18].

Нами было проведено исследование уровня экспрессии генов *HvGT-8*, *HvGT-10* и *HvGT-42* методом ПЦР в режиме реального времени в условиях моделирования холодого стресса у сортов озимого ячменя Тереза и Нектария, обладающих различным уровнем морозостойкости. Уровень экспрессии указанных генов измеряли через 4 ч после наступления соответ-

ствующего этапа моделируемых условий, выделенного в таблице 1 полужирным шрифтом.

Результаты изменения уровня экспрессии гена *HvGT-8* приведены на рисунке 1. Исследование уровня экспрессии данного гена показало снижение указанного показателя в сортах Тереза и Нектария на каждом из моделируемых этапов холодого стресса по сравнению с контрольными образцами за исключением сорта Нектария при наступлении условий $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ (4 ч), для которого оно оказалось статистически не достоверным (рис. 1). Снижение уровня экспрессии гомологичного гена *TaGT-8* также было показано J. Xiao с соавторами при анализе профилей экспрессии генов семейства Trihelix в листьях пшеницы, находящихся в условиях холодого стресса ($+4\text{ }^{\circ}\text{C}$) [6]. При $+2$ и $+2/-2\text{ }^{\circ}\text{C}$ изменение уровня экспрессии гена *HvGT-8* в исследуемых сортах было практически равным. Так, при $+2\text{ }^{\circ}\text{C}$ уровень экспрессии у Терезы и Нектария составлял 0,39 и 0,45; а при $+2/-2\text{ }^{\circ}\text{C}$ — 0,38 и 0,33 соответственно. При -2 и $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ у устойчивого к холоду сорта Тереза наблюдалось большее снижение уровня экспрессии гена *HvGT-8* по сравнению с чувствительным к холоду сортом Нектария. Для сорта Тереза значения данного показателя составили 0,26 и 0,24; для сорта Нектария — 0,51 и 0,54 соответственно от уровня его экспрессии в контрольных образцах. Наибольшее статистически значимое снижение уровня экспрессии данного гена для сорта Тереза наблюдалось через 4 ч после наступления

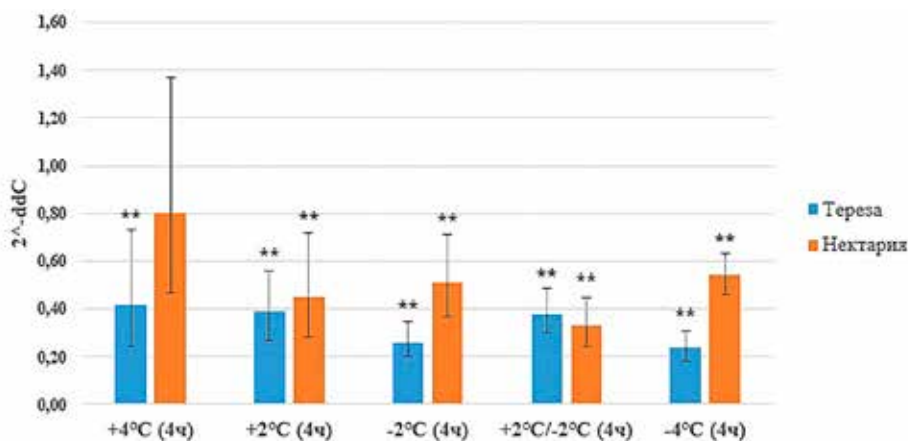


Рис. 1. Относительный уровень экспрессии гена *HvGT-8* у сортов озимого ячменя Тереза и Нектария в моделируемых условиях холодого стресса. На диаграмме представлены средние значения и стандартные отклонения. Уровень экспрессии гена *HvGT-8* у растений, не подвергающихся холодому стрессу, равен 1. $P < 0,01$ (**) по сравнению с контролем

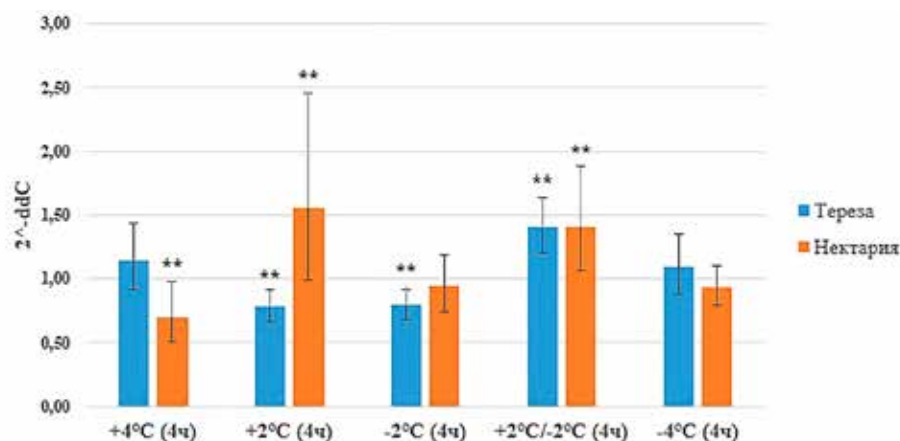


Рис. 2. Относительный уровень экспрессии гена *HvGT-10* у сортов озимого ячменя Тереза и Нектария в моделируемых условиях холодового стресса. На диаграмме представлены средние значения и стандартные отклонения. Уровень экспрессии гена *HvGT-10* у растений, не подвергающихся холодовому стрессу, равен 1. $P < 0,01$ (**) по сравнению с контролем

условий -4°C , а для сорта Нектария — через 4 ч после наступления условий $+2/-2^{\circ}\text{C}$ и для данных образцов оно было равным 0,24 и 0,33 при значении «1» в контрольных образцах, не подвергающихся холодовому стрессу.

При изучении уровня экспрессии гена *HvGT-10* (рис. 2) для сорта Тереза было показано статистически значимое изменение уровня его экспрессии от снижения до 0,78 при $+2^{\circ}\text{C}$ до увеличения в 1,40 раза при $+2/-2^{\circ}\text{C}$ по сравнению с уровнем его экспрессии в контрольных образцах. Для сорта Нектария наблюдались статистически значимые колебания уровня экспрессии гена *HvGT-10* от снижения до 0,70 при $+4^{\circ}\text{C}$ до увеличения в 1,56 раза при $+2^{\circ}\text{C}$ по сравнению с уровнем его экспрессии в контрольных образцах. Следует отметить, что при $+2/-2^{\circ}\text{C}$ изменение уровня экспрессии данного гена, так же как и гена *HvGT-8*, в исследуемых сортах было практически равным. В указанных условиях было показано увеличение его экспрессии в 1,40 раза для сорта Тереза и 1,41 раза для сорта Нектария по сравнению с уровнем его экспрессии в контрольных образцах. При $+2^{\circ}\text{C}$ для сорта Тереза наблюдалось снижение уровня экспрессии гена *HvGT-10* до 0,78; в то время как для сорта Нектария — увеличение в 1,56 раза. В исследовании К. Ли с соавторами было показано, что большинство генов семейства Trihelix в листьях сорго проявляли высокий уровень экспрессии после 2-часового воздействия низкой температуры ($+4^{\circ}\text{C}$), однако

были и те, которые экспрессировались после 24-часового воздействия холодового стресса, в том числе и гомологичный ген *SbTH-10* [16]. Увеличение уровня экспрессии гомологичного гена *TaGT-10* было показано в вышеупомянутом исследовании J. Хiao с соавторами [6], что согласуется с данными, полученными для сорта Нектария.

Исследование уровня экспрессии гена *HvGT-42* (рис. 3) показало статистически значимое увеличение указанного показателя для сорта Нектария через 4 ч после наступления условий -2°C , которое колебалось от 1,84 раза через 4 ч после наступления условий -4°C , и до 2,60 раза через 4 ч после наступления условий $+2/-2^{\circ}\text{C}$. Следует отметить, что экспрессия данного гена возрастала также и у сорта Тереза в 1,46 и 1,51 раза через 4 ч после наступления условий $+2$ и -4°C соответственно. Однако при наступлении условий $+4$, -2 и $+2/-2^{\circ}\text{C}$ (4 ч) у данного сорта наблюдалось уменьшение показателя уровня экспрессии гена *HvGT-42*, который составил 0,82; 0,72 и 0,41 при значении «1» в контрольных образцах, не подвергающихся холодовому стрессу, соответственно. Как и для гена *HvGT-8*, при -2°C у устойчивого к холоду сорта Тереза наблюдалось снижение уровня экспрессии гена *HvGT-42* до 0,72; в то время как для чувствительного к холоду сорта Нектария наблюдалось его увеличение в 2,18 раза. При $+2/-2^{\circ}\text{C}$ также наблюдалось снижение уровня экспрессии гена *HvGT-42* до 0,41 для сорта Тереза

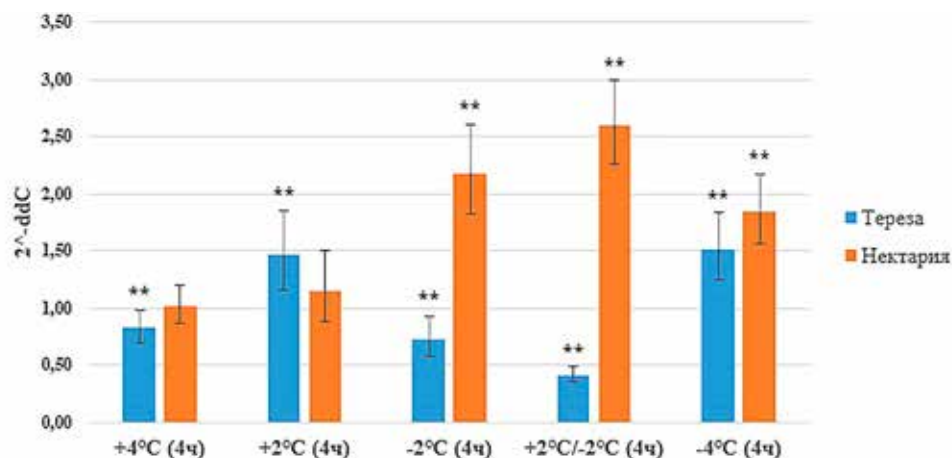


Рис. 3. Относительный уровень экспрессии гена *HvGT-42* у сортов озимого ячменя Тереза и Нектария в моделируемых условиях холодного стресса. На диаграмме представлены средние значения и стандартные отклонения. Уровень экспрессии гена *HvGT-42* у растений, не подвергающихся холодному стрессу, равен 1. $P < 0,01$ (**)

и увеличение в 2,60 раза для сорта Нектария. Как и для сорта Нектария, увеличение уровня экспрессии гена *ShCIGT*, гомологичного гену *HvGT-42*, было показано С. Yu с соавторами при исследовании холодного стресса и засухи у томатов [19].

Таким образом, результаты показывают, что на отдельных этапах моделирования условий воздействия холодного стресса уровень экспрессии генов *HvGT-8*, *HvGT-10* и *HvGT-42* различается. В ходе проведенного исследования было показано уменьшение уровня экспрессии гена *HvGT-8* как у устойчивого к холоду сорта Тереза, так и у чувствительного к холоду сорта Нектария. При этом при -2 и -4 °C у сорта Тереза наблюдалось большее снижение уровня экспрессии данного гена по сравнению с сортом Нектария. Различие в уровне экспрессии было установлено также и для генов *HvGT-10* и *HvGT-42*. Однако для указанных генов было установлено снижение их уровня экспрессии у сорта Тереза и увеличение у сорта Нектария (при $+2$ °C для гена *HvGT-10* и при -2 и $+2/-2$ °C для гена *HvGT-42*). До настоящего времени в научной литературе для ячменя не было описано влияние холодного стресса на уровень экспрессии генов семейства Trihelix. Полученные результаты говорят о возможном участии исследуемых генов в ответ на холодный стресс и подтверждают данные о том, что гены семейства Trihelix демонстрируют многовариантную реакцию в ответ на абиотический стресс, в том числе и холодный, при

этом важно учитывать виды стресса, а также силу и его длительность [6].

В настоящее время ведутся поиски корреляции между уровнем экспрессии отдельных генов, кодирующих семейство белков Trihelix, и силой ответа на разные виды стресса, включая морозостойкость, с целью поиска молекулярных маркеров, позволяющих упростить селекционный отбор [6]. Однако морозостойкость — это полигенный признак, и контролирующие его гены, в том числе и гены семейства Trihelix, расположены практически на всех хромосомах. Гены *HvGT-8*, *HvGT-10* и *HvGT-42* являются частью всей совокупности этих генов, и анализ уровня только их экспрессии не может объяснить всех фенотипических отличий по данному признаку. Тем не менее важно понимать вклад каждого гена для разработки стратегии геномной селекции.

Заключение

В результате исследования показано влияние холодного стресса в моделируемых условиях на уровень экспрессии генов *HvGT-8*, *HvGT-10* и *HvGT-42* в сортах озимого ячменя Тереза и Нектария, обладающих различным уровнем морозостойкости. Так было выявлено статистически значимое ($P < 0,01$) снижение уровня экспрессии гена *HvGT-8* во всех изученных образцах на каждом из моделируемых этапов холодного стресса по сравнению с контрольными образцами. При наступлении условий $+2$ °C (4 ч) и $+2/-2$ °C (4 ч) уровень его

экспрессии у данных сортов оказался практически равным, в то время как при -2 и -4 °C у устойчивого к холоду сорта Тереза наблюдалось большее снижение уровня экспрессии данного гена по сравнению с чувствительным к холоду сортом Нектария. Самый низкий показатель уровня экспрессии гена *HvGT-8* для сорта Тереза наблюдался через 4 ч после наступления условий -4 °C, и для данного образца он составил 0,24; а для сорта Нектария — через 4 ч после наступления условий $+2/-2$ °C и составил 0,33 при значении «1» в контрольных образцах, не подвергающихся холодному стрессу. При изучении уровня экспрессии гена *HvGT-10* для сорта Тереза было показано статистически значимое изменение уровня его экспрессии от снижения до 0,78 при $+2$ °C до увеличения в 1,40 раза при $+2/-2$ °C, а для сорта Нектария — от снижения до 0,70 при $+4$ °C до увеличения в 1,56 раза при $+2$ °C по сравнению с уровнем его экспрессии в контрольных образцах. Показано наибольшее статистически значимое увеличение уровня экспрессии гена *HvGT-42* для сорта Тереза в 1,51 раза при -4 °C и для сорта Нектария в 2,60 раза при $+2/-2$ °C. Для сорта Тереза также было показано статистически достоверное снижение уровня экспрессии указанного гена при $+4$, -2 и $+2/-2$ °C (4 ч) до 0,82, 0,72 и 0,41 при значении «1» в контрольных образцах, не подвергающихся холодному стрессу, соответственно.

Таким образом, уровень экспрессии генов *HvGT-8*, *HvGT-10* и *HvGT-42*, в сортах озимого ячменя различается в ответ на моделирование холодного стресса. В связи с этим представляет интерес изучение экспрессии указанных генов в совокупности с другими генами, влияющими на данный признак.

Список использованных источников

1. Озимый ячмень: основные элементы агротехники / А. А. Зубкович [и др.] // Земледелие и защита растений. Наука — производству. Озимые зерновые культуры: совершенствование технологии возделывания. — 2018. — № 4. — Р. 23–26.
2. New insights on key genes involved in drought stress response of barley: gene networks reconstruction, hub, and promoter analysis / M. J. Seyedeh [et al.] // J Genet Eng Biotechnol. — 2021. — Vol. 19, № 2. — Р. 1–12.
3. Сельское хозяйство Республики Беларусь: Статистический буклет / 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. — 2023. — 36 с.
4. Transgenic barley lines prove the involvement of *TaCBF14* and *TaCBF15* in the cold acclimation process and in frost tolerance / A. Soltész [et al.] // Journal of Experimental Botany. — 2013. — Vol. 64, № 7. — Р. 1 849–1 862.
5. Transcriptome-wide identification and expression profiling analysis of *Chrysanthemum trihelix* transcription factors / A. Song [et al.] // Int. J. Mol. Sci. — 2016. — Vol. 17, № 198. — Р. 1–13.
6. Genome-wide identification and expression profiling of trihelix gene family under abiotic stresses in wheat / J. Xiao [et al.] // BMC Genomics. — 2019. — Vol. 2, № 287. — Р. 1–12.
7. Repression of seed maturation genes by a Trihelix transcriptional repressor in *Arabidopsis* seedlings / M.-J. Gao [et al.] // The Plant Cell. — 2009. — Vol. 21. — Р. 54–71.
8. Genome-wide characterization and identification of Trihelix transcription factor and expression profiling in response to abiotic stresses in rice (*Oryza sativa* L.) / J. Li [et al.] // Int J Mol Sci. — 2019. — Vol. 20, № 251. — Р. 1–24.
9. Genomic, expressional, protein-protein interaction analysis of Trihelix transcription factor genes in *Setaria italica* and inference of their evolutionary trajectory / Z. Wang [et al.] // BMC Genomics. — 2018. — Vol. 19, № 665. — Р. 1–12.
10. Comparison of Trihelix transcription factors between wheat and *Brachypodium distachyon* at genome-wide / C. Wang [et al.] // BMC Genomics. — 2019. — Vol. 20, № 142. — Р. 1–14.
11. АгроСборник.Ру [Электронный ресурс]. — Режим доступа: <https://agrosbornik.ru/sorta-ya-chmmenia/44-2011-11-06-17-20-35/581-2011-11-08-19-43-58.html>. — Дата доступа: 09.01.2024.
12. Winter barley variety trial / H. Darby [et al.] // Northwest Crops & Soils Program. — 2014. — Vol. 179. — Р. 1–9.
13. Livak, K. J. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR

- and the 2(-Delta Delta C(T)) Method / K. J. Livak, T. D. Schmittgen // *Methods*. – 2001. – Vol. 25, № 4. – P. 402-408.
14. Guide to performing relative quantitation of gene expression using real-time quantitative PCR / *Applied Biosystems*, 2008. – 70 p.
15. Is there a role for trihelix transcription factors in embryo maturation? / M. S. Barr [et al.] // *Plant Signal Behav.* – 2012. – Vol. 7, № 2. – P. 205–209.
16. Genome-wide identification and expression profile analysis of trihelix transcription factor family genes in response to abiotic stress in sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] / K. Li [et al.] // *BMC Genomics*. – 2021. – Vol. 22, № 738. – P. 1–17.
17. Identification and analysis of differentially expressed trihelix genes in maize (*Zea mays*) under abiotic stresses / D. Zhao [et al.] // *PeerJ*. – 2023. – Vol. 11. – P. 1–20.
18. Genome-wide identification, phylogenetic analysis, and expression profiles of trihelix transcription factor family genes in quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) under abiotic stress conditions / K. Li [et al.] // *BMC Genomics*. – 2022. – Vol. 23, № 499. – P. 1–19.
19. ShCIGT, a Trihelix family gene, mediates cold and drought tolerance by interacting with SnRK1 in tomato / C. Yu [et al.] // *Plant Sci.* – 2018. – Vol. 270. – P. 140–149.

A. N. Zainchkovskaya, A. A. Famina, O. Yu. Urbanovich

STUDY OF THE EXPRESSION LEVEL OF THE *HvGT-8*, *HvGT-10* AND *HvGT-42* GENES IN WINTER BARLEY VARIETIES UNDER SIMULATED COLD STRESS CONDITIONS

State Scientific Institution

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

34 F. Skorina St., 220141 Minsk, the Republic of Belarus

e-mail: O.Urbanovich@igc.by

The expression level of the genes *HvGT-8*, *HvGT-10* and *HvGT-42*, encoding proteins of the Trihelix family, was studied in the winter barley varieties Teresa and Nectaria, which have different levels of frost resistance under simulated cold stress conditions. A statistically significant decrease in the expression level of the *HvGT-8* gene in these varieties was shown at each of the simulated stages of cold stress, with the exception of the Nectaria variety when conditions reached +4°C. When studying the expression level of the *HvGT-10* gene for the Teresa variety, a statistically significant change in its expression level was shown from a decrease to 0.78 at +2°C to an increase by 1.40 times at +2°C/–2°C. For the Nectaria variety, statistically significant fluctuations in the expression level of the *HvGT-10* gene were observed from a decrease to 0.70 at +4°C to an increase by 1.56 times at +2°C. The study of the expression level of the *HvGT-42* gene revealed a statistically significant increase in its expression level for the Nectaria variety in 4 hours after the onset of conditions –2°C. The expression of this gene also increased in the Teresa variety by 1.46 and 1.51 times under conditions of +2°C and –4°C respectively. However, upon the onset of conditions +4°C, –2°C and +2°C/–2°C, a decrease in the expression level of the specified gene was observed in this variety.

Keywords: winter barley, frost resistance, Trihelix gene family, gene expression level, transcription factors.

Дата поступления в редакцию: 01 февраля 2024 г.

Е. В. Лагуновская

МИКРОСАТЕЛЛИТНЫЕ МАРКЕРЫ, АССОЦИИРОВАННЫЕ С ПАРАМЕТРАМИ АНДРОГЕНЕЗА *IN VITRO*, У ТРИТИКАЛЕ (\times *TRITICOSECALE* WITTM.) И ПШЕНИЦЫ (*TRITICUM AESTIVUM*)

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

Для идентификации микросателлитных локусов и аллелей, ассоциированных с параметрами андрогенеза *in vitro* у гексаплоидного тритикале (\times *Triticosecale* Wittm.) и мягкой пшеницы (*Triticum aestivum*), проведен скрининг по пяти микросателлитным локусам (*Xgwm312*, *Xbarc318*, *Xgwm291*, *Xgwm156*, *Xgwm540*) 192 индивидуальных растений F_2 тритикале и по трем микросателлитным локусам (*Xgwm291*, *Xgwm371*, *Xgwm595*) 95 растений F_2 пшеницы. С использованием анализа молекулярной дисперсии (AMOVA) установлено, что все исследованные локусы тритикале вносят статистически значимый вклад в изменчивость параметров андрогенеза *in vitro* «частота регенерации зеленых растений» и «частота регенерации хлорофилл-дефектных растений». У мягкой пшеницы локусы *Xgwm371* и *Xgwm595* вносят значимый вклад в изменчивость параметров «способность к эмбриогенезу» и «выход новообразований» (локус *Xgwm371*). Для установления ассоциации между определенной комбинацией аллелей каждого локуса тритикале и пшеницы и способностью к андрогенезу *in vitro* рассчитывали χ^2 Пирсона. Установлена значимая связь между наличием аллелей 219 п. н. (*Xgwm312*), 290 п. н. (*Xbarc318*), 146 п. н. (*Xgwm291*), 310 п. н. (*Xgwm156*), 121 п. н. (*Xgwm540*) и высокой частотой регенерации зеленых и хлорофилл-дефектных растений тритикале. Для мягкой пшеницы обнаружена связь между наличием аллеля 169 п. н. локуса *Xgwm371* и высоким выходом новообразований в культуре пыльников *in vitro*.

Ключевые слова: тритикале, пшеница, \times *Triticosecale* Wittm, *Triticum aestivum*, гибриды F_2 , культура пыльников *in vitro*, параметры андрогенеза *in vitro*, микросателлитные локусы.

Введение

Зерновые злаки, к которым относятся тритикале (\times *Triticosecale* Wittm.) и пшеница (*Triticum aestivum*), являются важными сельскохозяйственными культурами во многих странах мира, в том числе и в Республике Беларусь. Выведение высокопродуктивных сортов тритикале и пшеницы считается основной задачей селекции, однако низкое генетическое разнообразие данных культур и большое количество времени, затрачиваемое на создание сорта методами классической селекции, значительно усложняет данный процесс [1, 2]. Одним из способов ускоренного создания новых сортов является использование биотехнологических методов, в частности, культуры пыльников *in vitro*. Применение данной методики позволяет в сжатые сроки, за один этап, получить полностью гомозиготные линии удвоенных гаплоидов из гетерозиготных

гибридов ранних поколений [3] и на их основе создать новые высокопродуктивные сорта, тогда как при использовании традиционных методов селекции для получения генетически выровненного селекционного материала используется самоопыление в течение многих поколений. Однако повсеместному и широкому применению данного метода препятствует достаточно низкая отзывчивость тритикале и пшеницы в культуре пыльников *in vitro*. Количество гаплоидных клеток в пыльнике, в зависимости от вида и сорта, составляет от нескольких тысяч до миллионов, но при этом выход гаплоидных растений-регенерантов у злаков часто исчисляется долями процентов [4]. К тому же наблюдается слабая выживаемость регенерантов и высокое количество хлорофилл-дефектных растений, неспособных расти и развиваться вне культуральных условий [5, 6]. Поскольку основным

фактором, определяющим эффективность андрогенеза *in vitro*, является генотип донорного растения [7–9], одна из важнейших задач исследователей — поиск молекулярно-генетических маркеров, позволяющих на ранних этапах, до введения в культуру *in vitro*, идентифицировать высоко- и низкоотзывчивые генотипы. Это позволит значительно повысить эффективность метода и сократить затраты труда и ресурсов для получения нового генетического материала.

Микросателлитные повторы, широко распространенные в растительных геномах, являются молекулярными маркерами, применяемыми для идентификации генов, ассоциированных с желательными признаками. Высокий уровень аллельной варибельности, кодоминантное наследование и возможность автоматического анализа делают их высокоинформативными молекулярными маркерами в таких исследованиях, как генотипирование, картирование или позиционное клонирование генов [10]. Метод, основанный на использовании SSR-маркеров, обладает высокой разрешающей способностью, хорошей воспроизводимостью и достаточно прост в использовании. Его применение для нахождения генов и генетических систем, связанных с высоким эмбрионным потенциалом в культуре пыльников *in vitro*, позволяет прогнозировать отзывчивость генотипов, вводимых в культуру клеток и тканей, что ведет к повышению эффективности метода культуры пыльников.

Используемые в данном исследовании расщепляющиеся популяции F_2 были созданы нами на основе родительских генотипов тритикале и пшеницы, контрастных по параметрам андрогенеза *in vitro*. Для подбора родительских пар для скрещивания в культуру пыльников *in vitro* были введены 23 генотипа тритикале и 22 генотипа пшеницы, оценен их эмбрионный потенциал и отобраны генотипы тритикале и пшеницы, наиболее различающиеся по значениям параметров андрогенеза *in vitro* [11–13].

В результате скрещиваний отобранных родительских генотипов нами получено по четыре популяции гибридных растений F_2 мягкой пшеницы (DH 48-02-06 × Ростань, DH 52-02-06 × Ростань, Ростань × DH 48-02-06, Ростань × DH 52-02-06) и гексаплоидного

тритикале (DH 3-1-09 × DH 27-1-08-1, DH 27-1-08-1 × DH 3-1-09, DH 11-2-09 × DH 12-1-09, DH 12-1-09 × DH 11-2-09), которые использовались в данном исследовании.

Для выявления микросателлитных локусов, ассоциированных с отзывчивостью в культуре пыльников *in vitro*, у родительских генотипов пшеницы и тритикале, контрастных по параметрам андрогенеза *in vitro*, был проанализирован полиморфизм 35 SSR-локусов (для тритикале) и 20 SSR-локусов (для пшеницы) и выделены полиморфные локусы. Для тритикале полиморфизм выявлен по локусам *Xgwm312*, *Xbarc318*, *Xgwm291*, *Xgwm156*, *Xgwm540*; для пшеницы — по локусам *Xgwm291*, *Xgwm595* и *Xgwm371* [12, 14–16].

Целью данного исследования являлось выявление связи между аллельными вариантами микросателлитных локусов и параметрами андрогенеза *in vitro* у тритикале (× *Triticosecale* Wittm.) и пшеницы (*Triticum aestivum*) с использованием расщепляющихся гибридных популяций F_2 .

Материалы и методы

Объектом исследования служили гибриды F_2 тритикале (DH 3-1-09 × DH 27-1-08-1, DH 27-1-08-1 × DH 3-1-09, DH 11-2-09 × DH 12-1-09, DH 12-1-09 × DH 11-2-09) и пшеницы (DH 48-02-06 × Ростань, DH 52-02-06 × Ростань, Ростань × DH 48-02-06, Ростань × DH 52-02-06), полученные нами с использованием родительских генотипов, контрастных по параметрам андрогенеза *in vitro* [11–13].

Для культивирования пыльников срезанные колосья выдерживали в течение 21 дня для тритикале и 7 дней для пшеницы при +4 °С, пыльники изолировали на стадии поздних одноядерных микроспор и культивировали по методике [17]. Отзывчивость в культуре пыльников определяли отдельно для каждого индивидуального растения. Эффективность морфогенетических процессов оценивали по следующим параметрам: «способность к эмбриогенезу»; «способность к регенерации» (наличие хотя бы одного новообразования либо растения-регенеранта считалось как «1», отсутствие — как «0»); «выход новообразований» (эмбриоидов и каллусов) и «выход растений-регенерантов» — процент от числа инокулированных пыльников; «частота регенерации

зеленых растений» и «частота регенерации хлорофилл-дефектных растений» — процент от числа полученных новообразований.

Выделение геномной ДНК проводили из флаговых листьев стандартным фенольно-хлороформным методом [18]. Анализ качества и количества выделенной ДНК проводили

в 1%-ом агарозном геле и на спектрофотометре «Ultrospec 3300 pro» (Amersham Biosciences).

Для индивидуальных растений в популяциях F_2 определяли аллельное состояние SSR-локусов, полиморфных у родительских генотипов [12, 14], различающихся по отзывчивости в культуре пыльников *in vitro* (табл. 1).

Таблица 1

Характеристика микросателлитных локусов, использованных в исследовании

Локус	Культура	Размер фрагмента, п. н.	Количество аллелей	Температура отжига, °С	Флуоресцентная метка
<i>Xgwm312</i>	тритикале	195; 219	2	60,0	R6G
<i>Xbarc318</i>	тритикале	260; 290	2	50,0	R6G
<i>Xgwm291</i>	тритикале	146; 170	2	64,0	TAMRA
	пшеница	140; 168	2		
<i>Xgwm156</i>	тритикале	287; 290; 310	3	60,0	ROX
<i>Xgwm540</i>	тритикале	121; 132	2	57,0	R6G
<i>Xgwm595</i>	пшеница	146; 182	2	64,0	R6G
<i>Xgwm371</i>	пшеница	169; 185	2	64,0	ROX

Последовательности праймеров подбирали с использованием базы данных GrainGenes [19]. Для получения анализируемых фрагментов ПЦР с мечеными праймерами к выбранным локусам (табл. 1) проводили в объеме 25 мкл, содержащем из расчета на одну реакцию: $MgCl_2$ — 2 мМ; прямого и обратного праймеров — по 0,2 пМ; дНТФ — 80 мкМ; *Taq*-полимеразы — 1 ед.; деионизированной стерильной воды — до достижения конечного объема. Концентрация геномной ДНК составляла 100 нг на 25 мкл. Программа амплификации: 94,0 °С — 3 мин; 40 циклов: 94,0 °С — 1 мин, отжиг — 2 мин; 72,0 °С — 10 мин. Температуры отжига выбирали в зависимости от последовательности праймера (табл. 1).

Размеры полученных продуктов амплификации определяли с помощью капиллярного электрофореза, который проводили на генетическом анализаторе 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). В лунки платы вносили 1 мкл полученного ПЦР-продукта, 9 мкл деионизированного формамида и 0,5–1 мкл внутреннего стандарта Orange-500 DNA Size

Standard (NimaGene) в качестве маркера молекулярного веса. Анализ полученных данных осуществляли с помощью программы GeneMapper v.5.0.

Статистическую оценку проводили с использованием программ Microsoft Excel, GenAIEx v.6.5 (Microsoft Corporation, США) и SPSS v.20.0 (IBM, США). Для выявления микросателлитных локусов, позволяющих статистически значимо дифференцировать группы с низкими и высокими значениями параметров андрогенеза *in vitro* («способность к эмбриогенезу», «способность к регенерации», «выход новообразований», «выход растений-регенерантов», «частота регенерации зеленых растений», «частота регенерации хлорофилл-дефектных растений»), и расчета вклада каждого локуса в дифференциацию выделенных групп, различающихся по параметрам андрогенеза, проводили анализ молекулярной дисперсии AMOVA (Analysis of Molecular Variance) с помощью GenAIEx v.6.5. Принцип данного метода состоит в расчете генетических дистанций F_{ST} как меры дифференциации субпопуляций

(групп), на основании частот встречаемости аллелей по каждому локусу у изучаемых групп. Считали, что локус вносит статистически значимый вклад в дифференцировку групп при $p < 0,05$; при этом большим дифференцирующим потенциалом обладает локус с большим значением F_{ST} . Для анализа связи между аллельными вариантами исследуемых микросателлитных локусов и способностью к андрогенезу *in vitro* у растений F_2 тритикале и пшеницы прибегали к построению таблиц сопряженности, затем рассчитывали χ^2 Пирсона с использованием SPSS v.20.0. Уровень статистической значимости p при множественных сравнениях вычисляли экспериментально для каждого сравнения в процессе моделирования, использовали точный критерий Фишера. Статистически значимыми считали данные при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждения

Для идентификации микросателлитных локусов, ассоциированных с параметрами андрогенеза *in vitro* у мягкой пшеницы и гексаплоидного тритикале, растения F_2 вводили в культуру пыльников *in vitro* и оценивали отзывчивость для каждого индивидуального растения. Затем для индивидуальных растений F_2 определяли аллельный состав микросателлитных локусов, полиморфных у контрастных по параметрам андрогенеза *in vitro* родительских генотипов, и анализировали связь между наличием определенного аллеля и параметрами андрогенеза *in vitro*. Выбор локусов, использованных в исследовании, был обусловлен их расположением на хромосомах, для которых показана ассоциативная связь с процессами андрогенеза *in vitro* (2A, 2B, 5A, 5B) [20, 21].

Для оценки эмбриогенного потенциала в культуру пыльников *in vitro* были введены 192 индивидуальных растения F_2 из четырех популяций тритикале (DH 3-1-09 \times DH 27-1-08-1, DH 27-1-08-1 \times DH 3-1-09, DH 11-2-09 \times DH 12-1-09, DH 12-1-09 \times DH 11-2-09), и 95 растений из четырех популяций пшеницы (DH 48-02-06 \times Ростань, DH 52-02-06 \times Ростань, Ростань \times DH 48-02-06, Ростань \times DH 52-02-06) [12, 14]. В результате каждое растение было отнесено к одной из двух групп, характеризующихся наличием или отсутствием способности к эмбриогенезу и ре-

генерации растений, а также низким или высоким значением параметров андрогенеза *in vitro*. Для обеих культур по параметру «выход новообразований» низкими считали значения 0–10,0%; высокими — более 10,0%; по параметру «выход растений-регенерантов» низкими считали значения 0–2,0%; высокими — более 2,0%; по параметру «частота регенерации зеленых растений» низкими считали значения 0–2,0%; высокими — более 2,0%. По параметру «частота регенерации хлорофилл-дефектных растений» для тритикале низкими считали значения 0–10,0%, высокими — более 10,0%, для пшеницы низкими считали значения 0–5%, высокими — более 5% [22].

Анализ молекулярной дисперсии (AMOVA) изученных микросателлитных локусов образцов тритикале показал статистически значимые различия по частоте встречаемости аллельных вариантов данных локусов между группами генотипов с низкими и высокими значениями параметров андрогенеза *in vitro* «частота регенерации зеленых растений» и «частота регенерации хлорофилл-дефектных растений» (табл. 2). Не установлено статистически достоверной разницы по частотам аллелей изученных локусов между группами образцов, различающихся по параметрам андрогенеза *in vitro* «способность к эмбриогенезу», «способность к регенерации», «выход новообразований», «выход растений-регенерантов».

Согласно данным таблицы 2, все исследованные локусы позволяют дифференцировать образцы с низкой (0–2,0%) и высокой (>2,0%) частотой регенерации зеленых растений, а также образцы с низкой (0–10,0%) и высокой (>10,0%) частотой регенерации хлорофилл-дефектных растений тритикале в культуре пыльников *in vitro*. В группах с высокой частотой регенерации зеленых и хлорофилл-дефектных растений аллель 219 п. н. (*Xgwm312*) встречался соответственно, в 4,03 и 6,08 раз чаще, чем аллель 195 п. н. Также в данной группе преобладали аллели 290 п. н. (*Xbarc318*), 146 п. н. (*Xgwm291*), 290 и 310 п. н. (*Xgwm156*), 121 п. н. (*Xgwm540*). Аллели 260 п. н. (*Xbarc318*), 170 п. н. (*Xgwm291*), 287 п. н. (*Xgwm156*) и 132 п. н. (*Xgwm540*) были выявлены только в группах с низкими значениями указанных параметров.

Таким образом, локусы *Xgwm312*, *Xbarc318*,

Таблица 2

Идентификация локусов, обладающих дифференцирующим потенциалом по параметрам андрогенеза *in vitro* у тритикале

Локус	F_{ST} ; p (уровень значимости)	Аллель, п. н.	Частоты аллелей в группах, различающихся по параметрам андрогенеза, %	
			низкая частота регенерации зеленых растений (0–2,0%)	высокая частота регенерации зеленых растений (>2,0%)
<i>Xgwm312</i>	$F_{ST} = 0,178$; $p = 0,005$	195	96,4	3,6
		219	85,5	14,5
<i>Xbarc318</i>	$F_{ST} = 0,136$; $p = 0,007$	260	100,0	0
		290	92,4	7,6
<i>Xgwm291</i>	$F_{ST} = 0,353$; $p = 0,001$	146	88,5	11,5
		170	100,0	0
<i>Xgwm156</i>	$F_{ST} = 0,238$; $p = 0,001$	287	100,0	0
		290	89,9	10,1
		310	86,7	13,3
<i>Xgwm540</i>	$F_{ST} = 0,170$; $p = 0,007$	121	91,9	8,1
		132	100,0	0
<i>Xgwm312</i>	$F_{ST} = 0,301$; $p = 0,002$	195	97,4	2,6
		219	84,2	15,8
<i>Xbarc318</i>	$F_{ST} = 0,132$; $p = 0,018$	260	100,0	0
		290	91,0	9,0
<i>Xgwm291</i>	$F_{ST} = 0,346$; $p = 0,001$	146	89,6	10,4
		170	100,0	0
<i>Xgwm156</i>	$F_{ST} = 0,240$; $p = 0,001$	287	100,0	0
		290	91,7	8,3
		310	86,7	13,3
<i>Xgwm540</i>	$F_{ST} = 0,166$; $p = 0,004$	121	92,6	7,4
		132	100,0	0

Xgwm291, *Xgwm156* и *Xgwm540* вносят значимый вклад в изменчивость параметров андрогенеза *in vitro* «частота регенерации зеленых растений» и «частота регенерации хлорофилл-дефектных растений» у тритикале. При этом, исходя из рассчитанных значений F_{ST} большим потенциалом по дифференциации групп с низкими и высокими значениями частоты регенерации зеленых и хлорофилл-дефектных растений обладают локусы *Xgwm291* и *Xgwm156*, а наименьшим — локус *Xbarc318*.

Для индивидуальных растений F_2 пшеницы также был проведен анализ молекулярной дисперсии (AMOVA), который показал

статистически значимые различия по частоте встречаемости аллельных вариантов исследуемых локусов в группах генотипов, различающихся по способности к эмбриогенезу, а также в группах, характеризующихся высоким и низким выходом новообразований в культуре пыльников *in vitro* (табл. 3). Не установлено статистически значимой разницы по частотам аллелей изучаемых локусов между группами образцов, различающихся по параметрам андрогенеза «способность к регенерации», «выход растений-регенерантов», «частота регенерации зеленых растений», «частота регенерации хлорофилл-дефектных растений».

Таблица 3

Идентификация локусов, обладающих дифференцирующим потенциалом по параметрам андрогенеза *in vitro* у пшеницы

Локус	F _{ST} ; p (уровень значимости)	Аллель, п. н.	Частоты аллелей в группах, различающихся по параметрам андрогенеза, %	
			отсутствие способности к эмбриогенезу	наличие способности к эмбриогенезу
Xgwm291	F _{ST} = -0,018; p = 1,000	140	40,5	59,5
		168	39,9	60,1
Xgwm371*	F _{ST} = 0,038; p = 0,030	169	36,4	63,6
		185	45,0	55,0
Xgwm595*	F _{ST} = 0,044, p = 0,024	146	25,5	74,5
		182	44,8	55,2
Xgwm291	F _{ST} = -0,014; p = 0,999	140	низкий выход новообразований (0–10,0%) 43,2	высокий выход новообразований (>10,0%) 56,8
		168	47,1	52,9
Xgwm371*	F _{ST} = 0,048; p = 0,026	169	40,9	59,1
		185	53,8	46,3
Xgwm595	F _{ST} = 0,003; p = 0,261	146	38,3	61,7
		182	49,0	51,0

Примечание. * — локус вносит статистически значимый вклад в дифференцировку образцов

Установлены значимые различия по частоте встречаемости аллельных вариантов локусов Xgwm371 и Xgwm595 и способностью к эмбриогенезу в культуре пыльников *in vitro* у исследуемых растений F₂ мягкой пшеницы. В группе генотипов, проявивших способность к эмбриогенезу, аллели 169 п. н. локуса Xgwm371 и 146 п. н. локуса Xgwm595 встречались, соответственно, в 1,75 и 2,92 раза чаще, чем в группе генотипов, неспособных к эмбриогенезу в культуре пыльников. Полученные данные совпадают с результатами, полученными нами ранее для локуса Xgwm371 о связи аллеля 169 п. н. со способностью к эмбриогенезу *in vitro* [12].

Локус Xgwm371 также позволяет статистически значимо дифференцировать группы с низким (0–10,0%) и высоким (>10,0%) выходом новообразований: в группе генотипов с высоким выходом новообразований аллель 169 п. н. встречался в 1,44 раза чаще, чем в группе с низким выходом новообразований и в 1,28 раза чаще, чем аллель 185 п. н. (табл. 3).

Для установления ассоциаций между комбинациями аллелей каждого микросателлитного

локуса тритикале и пшеницы и способностью к андрогенезу *in vitro* строили модели сопряженности для каждого параметра андрогенеза: «способность к эмбриогенезу», «способность к регенерации», «выход новообразований», «выход растений-регенерантов», «частота регенерации зеленых растений», «частота регенерации хлорофилл-дефектных растений». Используемые модели распределения аллелей показывают, с какой частотой определенные комбинации аллелей встречаются у генотипов в группах с низким или высоким значением определенного параметра андрогенеза. Сравнивали три основные модели распределения аллелей. В модели 1 рассматривали три комбинации аллелей: генотипы несли либо одну из гомозигот, либо гетерозиготу. В модели 2 рассматривали две комбинации аллелей: генотипы, несущие гомозиготу 1, рассматривали отдельно от генотипов, несущих гомозиготу 2 + гетерозиготу. В модели 3 рассматривали две комбинации аллелей, противоположных модели 2: гомозигота 1 + гетерозигота; гомозигота 2. При отсутствии гетерозигот (локус Xgwm291 тритикале) рассматривали модель

с двумя гомозиготами. Если локус имел более двух аллелей (локус *Xgwm156* тритикале), то рассматривали дополнительные варианты комбинаций аллелей. В случае, когда статистически достоверными являлись все три модели для одного микросателлитного локуса, проводили попарное сравнение аллельного соотношения внутри моделей.

Для тритикале установлены статистически значимые различия по частоте встречаемости определенных аллельных комбинаций микросателлитных локусов между группами генотипов с низкими и высокими значениями параметров андрогенеза *in vitro* «частота регенерации зеленых растений» и «частота регенерации хлорофилл-дефектных растений». В таблице 4 показаны модели распределения аллелей, для которых уровень значимости $p < 0,05$.

При рассмотрении различных моделей распределения аллелей у индивидуальных растений F_2 тритикале получены данные, свидетельствующие о наличии статистически значимой

связи между аллельным состоянием микросателлитных локусов *Xgwm312*, *Xbarc318*, *Xgwm291*, *Xgwm156*, *Xgwm540* и параметрами андрогенеза *in vitro* «частота регенерации зеленых растений» и «частота регенерации хлорофилл-дефектных растений».

Установлено, что аллель 219 п. н. локуса *Xgwm312* ассоциирован с высокой частотой формирования зеленых и хлорофилл-дефектных растений (рис. 1).

При наличии данного аллеля в гомозиготном состоянии (генотип 219/219) количество растений, попадающих в группу с высокой частотой регенерации зеленых растений, увеличивалось как при рассмотрении модели 1 распределения аллелей — с 2,3% (генотип 195/195) до 20,0% (рис. 1А), так и модели 3 — с 4,5% (генотип 195/195 и 195/219) до 20,0% (рис. 1Б). При этом при рассмотрении модели 2 количество генотипов, попадающих в группу с высокой частотой регенерации зеленых растений, увеличивалось с 2,3% (генотип 195/195) только до

Таблица 4

Оценка связи между аллельным составом микросателлитных локусов и частотой регенерации зеленых и хлорофилл-дефектных растений тритикале в культуре пыльников *in vitro*

Комбинация аллелей	Частоты комбинаций аллелей в группах, %		χ^2	P	Частоты комбинаций аллелей в группах, %		χ^2	P
	низкая частота регенерации зеленых растений (0–2,0%)	высокая частота регенерации зеленых растений (>2,0%)			низкая частота регенерации хлорофилл-дефектных растений (0–10%)	высокая частота регенерации хлорофилл-дефектных растений (>10,0%)		
<i>Xgwm312</i>								
195/195	97,7	2,3	10,775	0,003	99,2	0,8	17,610	0,0001
195/219	89,1	10,9			87,0	13,0		
219/219	80,0	20,0			80,0	20,0		
195/195	97,7	2,3	9,029	0,018	99,2	0,8	16,501	0,0002
195/219 + 219/219	86,9	13,1			85,2	14,8		
195/195 + 195/219	95,5	4,5	6,135	0,044	96,0	4,0	7,211	0,033
219/219	80,0	20,0			80,0	20,0		
<i>Xbarc318</i>								
260/260	100,0	0	6,546	0,041	100,0	0,0	5,918	0,063*
260/290	100,0	0			100,0	0,0		
290/290	91,1	8,9			91,9	8,1		
260/260 + 260/290	100,0	0	6,546	0,008	100,0	0,0	5,918	0,015
290/290	91,1	8,9			91,9	8,1		

Окончание таблицы 4

Комбинация аллелей	Частоты комбинаций аллелей в группах, %		χ^2	P	Частоты комбинаций аллелей в группах, %		χ^2	P
	низкая частота регенерации зеленых растений (0–2,0%)	высокая частота регенерации зеленых растений (>2,0%)			низкая частота регенерации хлорофилл-дефектных растений (0–10%)	высокая частота регенерации хлорофилл-дефектных растений (>10,0%)		
Xgwm291								
146/146	88,5	11,5	11,669	0,001	86,9	10,4	10,549	0,002
170/170	100,0	0			100,0	0		
Xgwm156								
290/290	93,5	6,5	14,138	0,0004	93,5	6,5	12,965	0,001
290/310	85,1	14,9			89,4	10,6		
310/310	88,9	11,1			83,3	16,7		
287/287	100,0	0			100,0	0		
290/310	85,1	14,9	15,034	0,0003	89,4	10,6	10,583	0,003
287	100,0	0			100,0	0		
310	88,9	11,1	10,857	0,024	83,3	16,7	16,432	0,003
287	100,0	0			100,0	0		
Xgwm540								
121/121	89,9	10,1	8,885	0,008	90,8	9,2	8,033	0,018
121/132	100,0	0			100,0	0		
132/132	100,0	0			100,0	0		
121/121	89,9	10,1	8,885	0,003	90,8	9,2	8,033	0,005
121/132 + 132/132	100,0	0			100,0	0		

Примечание. * — значение p близко к границе статистической значимости

13,1% (генотипы 195/219 и 219/219) (табл. 4).

При анализе параметра «частота регенерации хлорофилл-дефектных растений» установлено, что количество растений, попадающих в группу с высокими значениями данного параметра, также увеличивалось с 0,8 (генотип 195/195) до 20,0% (генотип 219/219; модель 1) Наличие аллеля 195 п. н. статистически значимо приводило к снижению данных параметров (модель 2).

Для остальных исследованных локусов также определены аллели, ассоциированные с высокой частотой регенерации зеленых и хлорофилл-дефектных растений: 290 п. н. (*Xbarc318*), 146 п. н. (*Xgwm291*), 310 п. н. (*Xgwm156*) и 121 п. н. (*Xgwm540*) (табл. 4).

Аллели 260 п. н. (*Xbarc318*), 170 п. н. (*Xgwm291*), 287 п. н. (*Xgwm156*), 132 п. н. (*Xgwm540*) в наших исследованиях обнару-

живались только у растений с низкой частотой формирования зеленых и хлорофилл-дефектных растений.

Для пшеницы выявлены статистически значимые различия по частоте встречаемости определенных аллельных комбинаций микросателлитных локусов между группами генотипов с низким и высоким выходом новообразований (табл. 5).

Установлено, что аллель 169 п. н. локуса *Xgwm371*, расположенного на длинном плече хромосомы 5В, ассоциирован с высоким (>10,0%) выходом новообразований (рис. 2).

В гомозиготном состоянии данный аллель в 2,6 раза чаще встречался у образцов с высоким выходом новообразований как при рассмотрении модели 2 распределения аллелей (рис. 2), так и модели 1, для

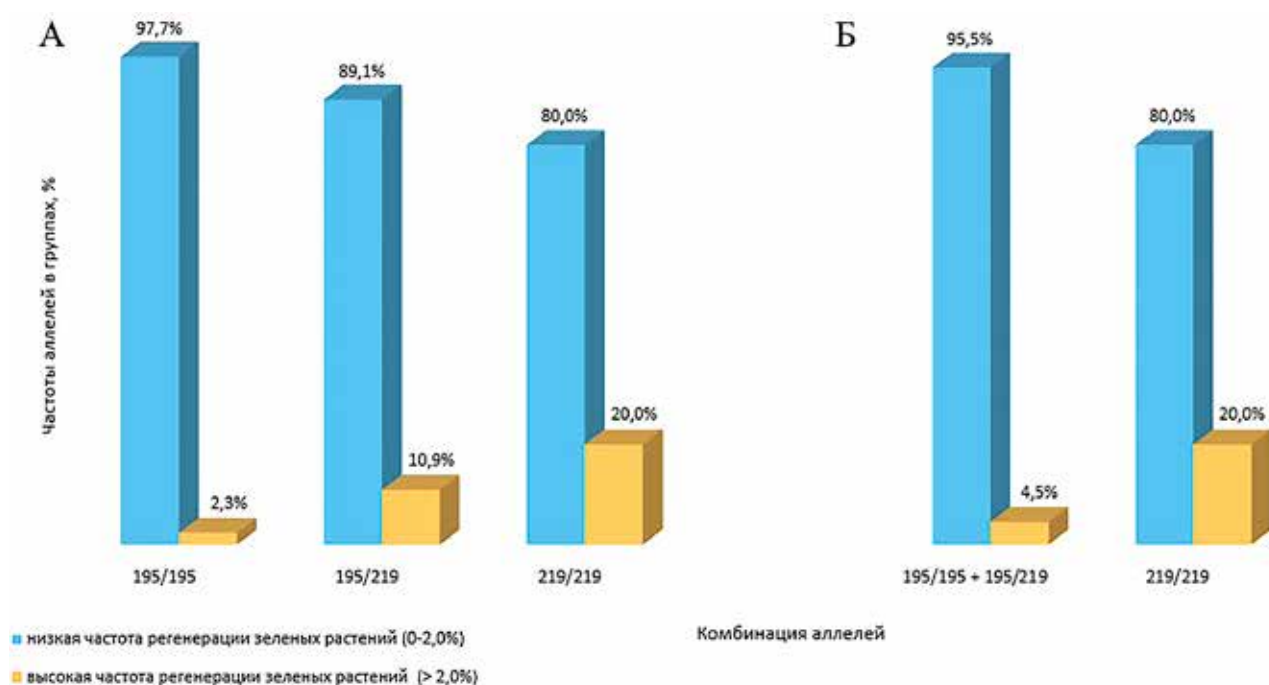


Рис. 1. Частота различных комбинаций аллелей локуса *Xgwm312* в исследованных группах растений тритикале: А — модель 1, Б — модель 3

Таблица 5

Оценка связи между аллельным составом микросателлитных локусов и выходом новообразований пшеницы в культуре пыльников *in vitro*

Комбинация аллелей	Частоты комбинаций аллелей в группах, %		χ^2	p
	низкий выход новообразований (0–10%)	высокий выход новообразований (>10%)		
<i>Xgwm291</i>				
140/140	42,9	57,1	0,104	1,000
140/168	44,4	55,6		
168/168	47,2	52,8		
140/140	42,9	57,1	0,079	1,000
140/168 + 168/168	46,9	53,1		
140/140 + 140/168	43,5	56,5	0,098	0,813
168/168	47,2	52,8		
<i>Xgwm371</i>				
169/169	27,6	72,4	6,037	0,052*
169/185	55,8	44,2		
185/185	50,0	50,0		
169/169	27,6	72,4	5,889	0,025
169/185 + 185/185	54,5	45,5		
169/169 + 169/185	45,7	54,3	0,090	0,780
185/185	50,0	50,0		

Окончание таблицы 5

Комбинация аллелей	Частоты комбинаций аллелей в группах, %		χ^2	p
	низкий выход новообразований (0–10%)	высокий выход новообразований (>10%)		
<i>Xgwm595</i>				
146/146	25,0	75,0	2,609	0,293
146/182	52,2	47,8		
182/182	48,3	51,7		
146/146	25,0	75,0	2,510	0,134
146/182 + 182/182	49,4	50,6		
146/146 + 146/182	42,9	57,1	0,267	0,673
182/182	48,3	51,7		

Примечание. * — значение p близко к границе статистической значимости

которой значение точного критерия Фишера находилось на границе статистической значимости (p = 0,052) (табл. 5). Присутствие аллеля 185 п. н. (модель 2, генотипы 169/185 и 185/185) приводило к уменьшению количества растений с высоким выходом новообразований на 26,9%, по сравнению с генотипом 169/169.

Таким образом, с помощью предложенных нами моделей выявлены аллели микросателлитных локусов тритикале и пшеницы, ассоциированные с высокими значениями параметров андрогенеза *in vitro*. Для тритикале аллели 219 п. н. (локус *Xgwm312*), 290 п. н. (*Xbarc318*), 146 п. н. (*Xgwm291*), 310 п. н. (*Xgwm156*), 121 п. н. (*Xgwm540*) ассоциированы с высоким выходом зеленых и хлорофилл-дефектных растений-регенерантов. Для пшеницы аллель 169 п. н. локуса *Xgwm371* ассоциирован со способностью к эмбриогенезу и высоким выходом новообразований. Также данный аллель, как и аллель 146 п. н. локуса *Xgwm595*, ассоциирован со способностью к эмбриогенезу. Поскольку в исследовании использовались микросателлитные локусы, расположенные на хромосомах 2A, 2B, 5A, 5B, для которых с использованием анеуплоидных и замещенных линий установлена связь с контролем процессов эмбриогенеза и регенерации растений в культуре пыльников *in vitro* [20, 21], можно предположить, что данные локусы тесно сцеплены с QTL, ассоциированными с соответствующими параметрами андрогенеза, и могут служить маркерами для отбора высокоотзывчивых генотипов

тритикале и пшеницы.

Также в ходе исследования нами были выявлены аллели микросателлитных локусов, ассоциированные со снижением отзывчивости в культуре пыльников *in vitro*: аллели 195 п. н. (локус *Xgwm312*), 260 п. н. (*Xbarc318*), 170 п. н. (*Xgwm291*), 287 п. н. (*Xgwm156*), 132 п. н. (*Xgwm540*) тритикале ассоциированы со снижением частоты регенерации зеленых и хлорофилл-дефектных растений; аллели 185 п. н. (*Xgwm371*), 182 п. н.

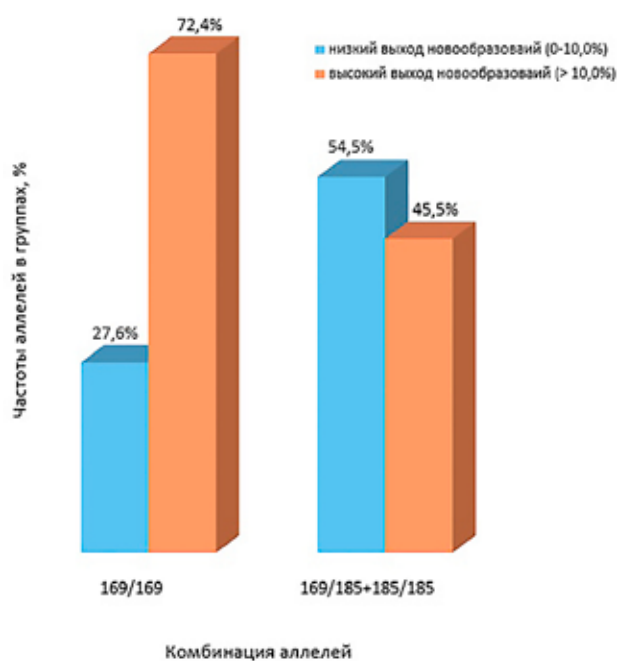


Рис. 2. Частота различных комбинаций аллелей локуса *Xgwm371* в исследованных группах растений пшеницы (модель 2)

(*Xgwm595*) пшеницы ассоциированы со снижением способности к эмбриогенезу и выходу новообразований (аллель 185 п. н. локуса *Xgwm371*). Данные аллели также могут быть использованы в качестве маркеров при скрининге генотипов перед введением в культуру пыльников *in vitro*, что позволит либо исключить низкоотзывчивые генотипы, либо, в том случае, если генотип представляет высокую селекционную ценность, увеличить объем пыльников, вводимых в культуру *in vitro*, для повышения вероятности получения эмбрионов и зеленых растений-регенерантов тритикале и пшеницы.

Следует отметить, что локусы, ассоциированные в нашем исследовании с частотой регенерации зеленых растений у тритикале, одновременно были ассоциированы и с частотой регенерации хлорофилл-дефектных растений. Подобные результаты получены и другими авторами, в частности, Muñoz-Amatriaín с соавторами [23] идентифицировали QTL, связанные с формированием хлорофилл-дефектных растений на хромосомах 3Н и 5Н ячменя в том же положении, что и QTL, ассоциированные с формированием зеленых растений-регенерантов. Krzewska с соавторами [24] обнаружили, что один из QTL, найденных ими на хромосоме 4R тритикале и ассоциированных с формированием хлорофилл-дефектных растений, расположен в той же области, что и QTL, связанный со способностью к регенерации зеленых растений. Одной из причин может являться то, что на формирование хлорофилл-дефектных растений, помимо генотипа, значительное влияние оказывают внешние условия, такие как тип и длительность предобработки колосьев, условия культивирования, размер и возраст эмбрионных структур, пересаживаемых на регенерационную среду и ряд других факторов [6, 9, 25].

Заключение

С использованием расщепляющихся популяций F_2 гексаплоидного тритикале и мягкой пшеницы, полученных от скрещивания родительских генотипов, контрастных по параметрам андрогенеза *in vitro*, выявлены микросателлитные локусы, ассоциированные с отзывчивостью в культуре пыльников. У тритикале локусы *Xgwm312*, *Xbarc318*,

Xgwm291, *Xgwm156*, *Xgwm540* ассоциированы с параметрами «выход зеленых растений» и «выход хлорофилл-дефектных растений». У пшеницы локусы *Xgwm371* и *Xgwm595* ассоциированы со способностью к эмбриогенезу *in vitro*; локус *Xgwm371* ассоциирован с параметром «выход новообразований». Данные микросателлитные локусы могут быть использованы в качестве маркеров для выявления высоко- и низкоотзывчивых генотипов тритикале и пшеницы на ранних стадиях, до введения в культуру пыльников, что значительно сократит объем прорабатываемого материала и повысит эффективность данной методики.

Список использованных источников

1. Bread wheat: a role model for plant domestication and breeding [Electronic resource] / E. Venske [et al.] // *Hereditas*. – 2019. – Vol. 156. Art.16. – Mode of access: <https://hereditasjournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s41065-019-0093-9#citeas>. – Date of access: 04.01.2021.
2. Крупин, П. Ю. Использование генетического потенциала многолетних дикорастущих злаков в селекционном улучшении пшеницы / П. Ю. Крупин, М. Г. Дивашук, Г. И. Карлов // *Сельскохозяйственная биология*. – 2019. – Т. 54, № 3. – С. 409–425.
3. Сельдимирова, О. А. Факторы, влияющие на отзывчивость в культуре *in vitro* изолированных пыльников злаков / О. А. Сельдимирова, В. И. Никонов // *Экобиотех*. – 2021. – Т. 4, № 2. – С. 107–120.
4. Эмбриологические основы андроклинии пшеницы / Н. Н. Круглова [и др.]. – М.: Наука. – 2005. – 99 с.
5. Картель, Н. А. Биотехнология в растениеводстве / Н. А. Картель, А. В. Кильчевский. – Мн., 2005. – 310 с.
6. Орлов, П. А. Функциональная геномика морфогенеза / П. А. Орлов. – Мн., 2005. – 518 с.
7. Ahmadi, B. *In vitro* androgenesis: spontaneous vs. artificial genome doubling and characterization of regenerants / B. Ahmadi, H. Ebrahimzadeh // *Plant Cell Rep*. – 2020. – Vol. 39. – P. 299–316.
8. Development of *in vitro* anther culture for doubled haploid plant production in indica rice (*Oryza sativa* L.) genotypes [Electronic resource] / C. Lantos [et al.] // *Plants*. – 2023. – Vol. 12(9). – Art. 1 774. – Mode of access: <https://www.mdpi>.

com/2223-7747/12/9/1774. – Date of access: 18.01.2024.

9. Круглова, Н. Н. Инновационная биотехнология андроклиной гаплоидии пшеницы на основе комплекса эмбриологических и цитологических данных / Н. Н. Круглова // ЭКОБИОТЕХ. – 2019. – Т. 2, № 3. – С. 234–245.

10. Омашева, М. Е. Молекулярные маркеры. Причины и последствия ошибок генотипирования / М. Е. Омашева, К. П. Аубакирова, Н. А. Рябушкина // Eurasian Journal of Applied Biotechnology. – 2013. – № 4. – С. 20–28.

11. Лагуновская, Е. В. Эффективность индукции андрогенеза *in vitro* у гексаплоидного тритикале / Е. В. Лагуновская // Настоящее и будущее биотехнологии растений: материалы Междунар. науч. конф., Минск, 24–26 мая 2023 г. / Национальная академия наук Беларуси; Центральный ботанический сад; Отделение биологических наук НАН Беларуси; Совет ботанических садов стран СНГ при МААН; редкол.: В. Н. Решетников [и др.]. – Минск : ИВЦ Минфина, 2023. – С. 130.

12. Лагуновская, Е. В. Идентификация микросателлитных локусов, ассоциированных с эмбрионным потенциалом у генотипов пшеницы в культуре пыльников *in vitro* // Е. В. Лагуновская // Молекулярная и прикладная генетика / Институт генетики и цитологии НАН Беларуси ; редкол. А. В. Кильчевский (гл. ред.) [и др.]. – Минск, 2021. – Т. 31. – С. 102–113.

13. Орлов, П. А. Генетические механизмы пыльцевого эмбриогенеза и его использование в селекции растений / П. А. Орлов, Е. В. Антоненко // Сб. науч. тр. / Ин-т генетики и цитологии НАН Беларуси. – Минск, 2007. – Т. 5 : Молекулярная и прикладная генетика. – С. 44–71.

14. Лагуновская, Е. В. Влияние аллелей SSR локусов на отзывчивость в культуре пыльников *in vitro* у генотипов тритикале // Биотехнология: достижения и перспективы развития: сборник материалов V международной научно-практической конференции, УО «Полесский государственный университет», г. Пинск, 25–26 ноября 2021 г. / Министерство образования Республики Беларусь [и др.]; редкол.: В. И. Дунай [и др.]. – Пинск: ПолесГУ, 2021. – С. 32–36.

15. Антоненко, Е. В. SSR анализ локусов 5А хромосомы мягкой пшеницы у геноти-

пов, контрастных по отзывчивости в культуре пыльников / Е. В. Антоненко // «Актуальные проблемы генетики и молекулярной биологии» в рамках фестиваля науки». Материалы научных докладов участников всероссийской молодежной конференции в рамках Федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 годы (Уфа, Россия, 24–28 сентября 2012 г.). – Уфа: Башкирский ГАУ, 2012. – С. 3–9.

16. Лагуновская, Е. В. Анализ полиморфизма микросателлитных локусов хромосом 2А и 2В у удвоенных гаплоидов тритикале / Е. В. Лагуновская, О. И. Зайцева // Экологическая стабилизация аграрного производства. Научные аспекты решения проблемы: сб. докл. Междунар. науч.-практ. конф. мол. уч. и спец., 18–19 марта 2015 г., Саратов, Россия / под общ. ред. д.с.-х.н. А. И. Прянишникова. – Саратов, 2015. – С. 68–72.

17. 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.

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

19. GrainGenes [Electronic resource]. – Mode of access: <https://wheat.pw.usda.gov/GG3/>. – Date of access: 19.01.2024.

20. Abd El-Fatah, B. E. S. Genetic analysis of anther culture response and identification of QTLs associated with response traits in wheat (*Triticum aestivum* L.). / B. E. S. Abd El-Fatah, M. A. Sayed, S. A. El-Sanusy // Mol Biol Rep. – 2020. – Vol. 47. – P. 9 289–9 300.

21. Torp, A. M. Chromosomal region associated with green plant regeneration in wheat (*Triticum aestivum* L.) anther culture / A. M. Torp, A. L. Hansen, S. B. Andersen // Euphytica. –

2001. – Vol. 119. – P. 377–387.

22. Мозгова Г. В. Использование пыльцевого эмбриогенеза в селекционном процессе : метод. рекомендации / Г. В. Мозгова, П. А. Орлов. – Минск: РУП «НПЦ НАН Беларуси по механизации сельского хозяйства», 2008. – 31 с.

23. Identification and validation of QTLs for green plant percentage in barley (*Hordeum vulgare* L.) anther culture / М. Muñoz-Amatriaín [et al.] // Mol Breeding. – 2008. – Vol. 22. – P. 119–129.

24. Quantitative trait loci associated with androgenic responsiveness in triticale (*×Triticosecale* Wittm.) anther culture / M. Krzewska [et al.] // Plant Cell Reports. – 2012. – Vol. 31. – P. 2 099–2 108.

25. Bolibok, H. Genetic mapping of QTLs for tissue-culture response in plants / H. Bolibok, M. Rakoczy-Trojanowska // Euphytica. – 2006. – Vol. 149. – P. 73–83.

E. V. Lagunovskaya

MICROSATELLITE MARKERS ASSOCIATED WITH *IN VITRO* ANDROGENESIS PARAMETERS IN TRITICALE (*× TRITICOSECALE* WITTM.) AND WHEAT (*TRITICUM AESTIVUM*)

State Scientific Institution

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

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

e-mail: e.antonenko@igc.by

To identify microsatellite loci and alleles associated with *in vitro* androgenesis parameters in hexaploid triticale (*× Triticosecale* Wittm.) and soft wheat (*Triticum aestivum*), screening was carried out by 5 microsatellite loci (*Xgwm312*, *Xbarc318*, *Xgwm291*, *Xgwm156* and *Xgwm540*) of 192 individual F₂ triticale plants and by 3 microsatellite loci (*Xgwm291*, *Xgwm371* and *Xgwm595*) of 95 F₂ wheat plants. Using the analysis of molecular variance (AMOVA), it was found that all the triticale loci studied make a statistically significant contribution to the variability of the *in vitro* androgenesis parameters “the frequency of green plants regeneration” and “the frequency of chlorophyll-deficient plants regeneration”. In soft wheat, the *Xgwm371* and *Xgwm595* loci make a significant contribution to the variability of the androgenesis parameter “the ability to embryogenesis” and the parameter “the success of embryoids and callus formation” (locus *Xgwm371*). To determine the association between a specific combination of alleles at each triticale and wheat locus and the ability to *in vitro* androgenesis, Pearson's χ^2 was calculated. A significant relationship was revealed between the presence of alleles 219 bp (locus *Xgwm312*), 290 bp (locus *Xbarc318*), 146 bp (locus *Xgwm291*), 310 bp (locus *Xgwm156*) and 121 bp (locus *Xgwm540*) and the high frequency of green and chlorophyll-deficient plants' regeneration; for soft wheat, a relationship was found between the presence of the 169 bp allele of the locus *Xgwm371* and the high output of embryoids in the *in vitro* anther culture.

Keywords: triticale, wheat, F₂ hybrids, *in vitro* anther culture, *in vitro* androgenesis parameters, microsatellite loci.

Дата поступления в редакцию: 06 февраля 2024 г.

Е. М. Кулик, Т. Н. Камедько, Р. М. Пугачёв

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ СОРТОВ ЗЕМЛЯНИКИ САДОВОЙ ПО ГЕНАМ АРОМАТА ПЛОДОВ *FaOMT* И *FaFAD1*

Учреждение образования

«Белорусская государственная орденов Октябрьской Революции и Трудового Красного Знамени
сельскохозяйственная академия»

Республика Беларусь, 213410, г. Горки, ул. Мичурина, 5

e-mail: ekaterinakulik113@gmail.com

Представлены результаты молекулярно-генетического анализа 154 сортов земляники садовой различного происхождения по генам, контролирующим аромат плодов. Генетический анализ проводился по двум генам аромата: *FaOMT*, который контролирует содержание мезифурана и локализован в дистальном районе длинного плеча хромосомы VII-F.1, и *FaFAD1*, который отвечает за синтез γ -декалактона и локализован в дистальном районе длинного плеча хромосомы III2 генома *F. × ananassa* Duch. Маркер *FaOMT-SI/NO* позволяет различать активные и неактивные аллельные формы гена *FaOMT* на основании их размера при амплификации, 248 и 217 п. н. соответственно. Маркер *FaFAD1* идентифицирует фрагмент размером 500 п. н., но он не позволяет различать доминантные гомозиготные и гетерозиготные линии. Активная аллельная форма гена *FaOMT* была идентифицирована у 90,9% из 154 проанализированных сортов земляники, в то время как неактивная аллельная форма гена была обнаружена у 28% образцов. Ген *FaFAD1* был идентифицирован у 29,2% генотипов. Также были выделены сорта земляники садовой, совмещающие функциональный аллель гена *FaFAD1* с гомозиготным состоянием активной аллельной формы гена *FaOMT* и сорта, характеризующиеся сочетанием функционального аллеля гена *FaFAD1* с гетерозиготным состоянием аллельной формы гена *FaOMT*. В результате проведенных исследований были выделены наиболее перспективные для селекции на аромат плодов генотипы, сочетающие в своем геноме оба гена аромата (*FaOMT*⁺ и *FaFAD1*): Alba, Antea, Brilla, Dahli, Destiny, Flair, Nademar, Honey, Hansalola, Joly, Korona, Limalexia, Olympia, Osiris, Pircinque, Salsa, Sapore, Sonata, Tea, Vicoda, Vima Tarda, Барокко, Классика, Торпеда.

Ключевые слова: аромат плодов, земляника садовая, сорта, мезифуран, γ -декалактон, молекулярно-генетический анализ.

Введение

Земляника садовая является представителем семейства розоцветных, рода *Fragaria*. Она является самой высокоурожайной культурой среди ягодных с мировым объемом производства более девяти миллионов тонн в год [1]. Ее популярность обусловлена скороспелостью, десертным вкусом, неповторимым ароматом и богатым биохимическим составом плодов [2].

Аромат плодов относится к потребительскому признаку сортов земляники и является одним из самых сложных ароматических комплексов среди ягодных культур, который включает более 350 летучих соединений, в том числе сложные эфиры, фураноны, терпены, альдегиды, кетоны, серосодержащие соедине-

ния, спирты и др. [3]. К числу ключевых компонентов ароматического комплекса плодов земляники относятся мезифуран, имеющий фруктовый, карамельный аромат, и γ -декалактон с персикоподобным, фруктовым, сладким ароматом, который представляет интерес для промышленности в качестве ароматизатора. Синтез мезифурана в плодах земляники контролируется геном *FaOMT*, γ -декалактона — геном *FaFAD1* [4].

В связи с тем, что аромат плодов является потребительским признаком и играет немаловажное значение в реализации продукции, изучение ароматического комплекса является актуальной задачей для селекции. Селекция земляники с использованием генетического

анализа позволяет ускорить отбор сложных признаков, таких как аромат, и с высокой надежностью определить присутствие в геноме необходимых генов и идентифицировать перспективные формы [5].

Цель настоящего исследования — проведение молекулярно-генетического анализа образцов рода *Fragaria* по генам аромата плодов *FaOMT* и *FaFAD1* для выявления генотипов, перспективных для селекции на качество ягод.

Материалы и методы

Молекулярно-генетический анализ проводили в научно-исследовательской генетической лаборатории УО БГСХА.

Объектами исследования являлись 154 образца земляники садовой из коллекции кафедр плодоовощеводства УО БГСХА, из

которых шесть сортов отечественной селекции (Барокко, 7.19–17/2 (Готика), Красный берег, Тарро, Татиус, Полли).

Экстракцию ДНК проводили из молодых листьев земляники с помощью набора для выделения ДНК K0512 Thermo Fisher Scientific, согласно протоколу производителя.

Для оценки аллельного состояния гена *FaOMT* использовали маркер *FaOMT-SI/NO*, гена *FaFAD1* — маркер *FaFAD1* [4].

Использованные для анализа праймеры были синтезированы ОДО «Праймтех» (Беларусь) (табл. 1).

Реакционная смесь для ПЦР объемом 20 мкл содержала: 1,5 мкл ДНК с концентрацией 20 нг/мкл; 0,2 мМ dNTPs; 0,25 мкМ каждого праймера; 0,2 U *Taq*-полимеразы и 1 мМ *Taq*-буфера (+ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, KCl + MgCl_2).

Таблица 1

Характеристика использованных в работе праймеров

Маркер	Нуклеотидная последовательность праймеров	Размер ампликонов, п. н.
FaOMT-SI/NO	F 5'CGATCATTTTCGAAAAGGACTA3' R 5'AAGCAGGGTTAGTTGTGGAGA3'	217, 248
FaFAD1	F 5'CGGGATTAATGGTTTTGTTGTTGACCGACC3' R 5'GTAGAAGAGAGAGACCAAGACGAG3'	500

Аmplификацию проводили в термоциклере C1000 производства фирмы Touch по следующим программам:

маркер *FaOMT*: денатурация: 94 °C — 2 мин, 10 циклов: 94 °C — 30 сек, 59,5 °C — 45 сек, 72 °C — 1 мин; 25 циклов: 94 °C — 30 сек, 55 °C — 45 сек, 72 °C — 1 мин; финальная элонгация: 72 °C — 5 мин;

маркер *FaFAD1*: денатурация: 94 °C — 4 мин, 25 циклов: 94 °C — 30 сек, 56 °C — 45 сек, 72 °C — 1 мин; финальная элонгация: 72 °C — 9,5 мин. Разделение ампликонов осуществляли методом электрофореза в 2%-ом агарозном геле. Для определения длины амплифицированных фрагментов использовали ДНК маркер молекулярного веса, M100bp (Праймтех).

Результаты и обсуждение

Содержание мезифурана в плодах земляни-

ки контролируется геном *FaOMT*, локализованным в дистальном районе длинного плеча хромосомы VII-F.1. Маркер *FaOMT-SI/NO* позволяет различать активные и неактивные аллельные формы гена *FaOMT* на основании размера их амплификации, 248 и 217 п. н. соответственно. По данным зарубежных исследований различие между функциональными и нефункциональными аллельными формами гена объясняется рядом однонуклеотидных инсерций/делеций общим размером 30 п. н. в промоторной области гена. Праймер *FaOMT-SI/NO* фланкирует район, содержащий указанные инсерции/делеции, позволяя идентифицировать активную аллельную форму размером 248 п. н. и неактивную аллельную форму размером 217 п. н. гена *FaOMT* [3, 4, 6].

По результатам наших исследований из 154 проанализированных сортов функциональную (активную) аллельную форму гена *FaOMT*

(*FaOMT+*) идентифицировали у 90,9% генотипов: Brilla, Fernando, Monterey, Olympia, Барокко, Витязь, Красный берег, Купчиха, Полли, Соловушка, Царица, Юния Смайде и др. Нефункциональную (неактивную) аллельную форму (*FaOMT-*) выявили у 28% образцов: Braiton, Chandler, Eva, Evita, Garigoûtte «Neuve», Gemil, Веснянка, Купчиха, Найдена добрая, Тарро и др.

При гетерозиготном сочетании аллелей гена *FaOMT* на электрофореграмме присутствуют оба целевых продукта. При наличии фрагмента 248 п. н. ампликон размером 217 п. н. может слабо визуализироваться, что может быть связано с недостаточным его синтезом. Сочетанием активной и неактивной аллельных форм гена

(гетерозиготный генотип *FaOMT+FaOMT-*) характеризуются 18,9% сортов, включенных в анализ: Aura, Christine, Premy, Rubis des Jardins, Sandra, Rokšana, Дивная, Кокинская ранняя, Славутич, Сударушка и др.

Гомозиготное состояние активной аллельной формы гена (генотип *FaOMT+FaOMT+*) выявлено у 72% образцов: Allegro, Asia, Vivara, Candiss, Marmolada, Malling Allure, Charlotte, Marigquette, Готика, Кокинская заря, Татиус, Троицкая и др., гомозиготное состояние неактивной аллельной формы гена (генотип *FaOMT-FaOMT-*) — у 9,1%: Aprica, Cleru, Emi, Жемчужница, Лакомка, Найдена добрая и др. (пример идентификации фрагментов приведен на рисунке 1).

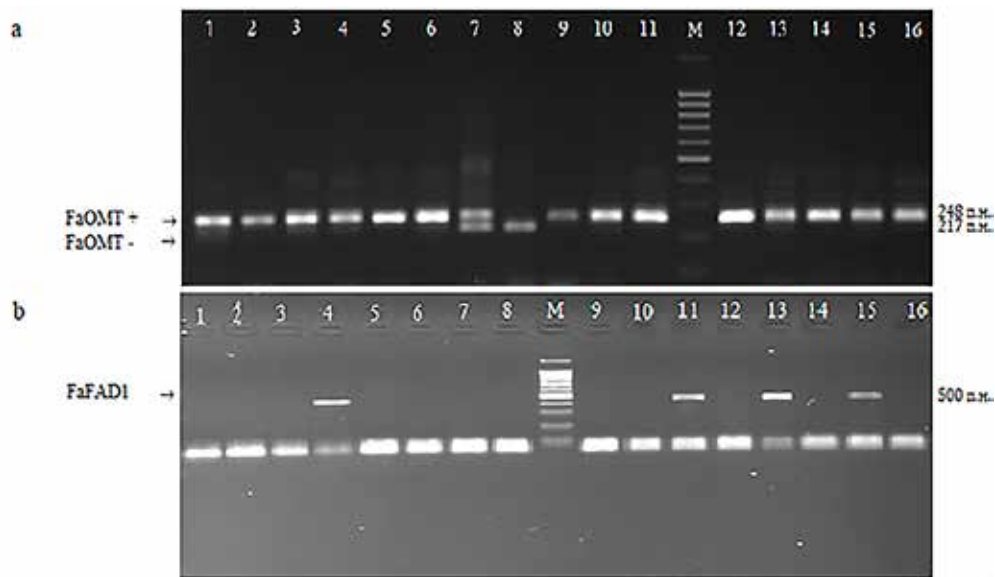


Рис. 1. Электрофоретический профиль маркеров *FaOMT-SI/NO* (a) 1 — Monterey; 2 — Marmolada; 3 — Malwina; 4 — Витязь; 5 — Полли; 6 — Дивная; 7 — Chandler; 8 — Vima Rina; 9 — Царица; 10 — Viktoriana; 11 — Vima Tarda; 12 — Спасская; 13 — Слононок; 14 — Торпеда; 15 — Росинка; 16 — Laura; M — маркер молекулярного веса; и *FaFAD1* (b) генотипов земляники: 1 — Monterey; 2 — Marmolada; 3 — Malwina; 4 — Барокко; 5 — Витязь; 6 — Полли; 7 — Дивная; 8 — Vima Rina; 9 — Царица; 10 — Viktoriana; 11 — Vima Tarda; 12 — Спасская; 13 — Садовый рубин; 14 — Слононок; 15 — Торпеда; 16 — Росинка; M — маркер молекулярного веса

Содержание γ -декалактона в плодах земляники контролируется геном *FaFAD1*, локализованным в дистальном районе длинного плеча хромосомы III2 генома *F. × ananassa* Duch [3]. Маркер *FaFAD1* является доминантным и идентифицирует фрагмент размером 500 п. н., что свидетельствует о наличии гена *FaFAD1*, но не позволяет различать доминантные гомозиготные и гетерозиготные линии. У генотипов с отсутствием гена, кодирующего

γ -декалактон, данный фрагмент не амплифицируется [6, 7, 8].

С помощью анализа была обнаружена основная вариация присутствия-отсутствия *FaFAD1* среди 154 продуцентов и непродуцентов γ -декалактона в сортах земляники. В результате ген *FaFAD1* идентифицирован у 29,2% генотипов: Alba, Elly, Flair, Hademar, Sapore, Gemil, Osiris, Sonata, Vima Tarda, Барокко, Классика и др. По данным зарубежных

исследований подтверждена корреляция между наличием аллеля *FaFAD1* и синтезом γ -декалактона в плодах земляники. Присутствие ампликона размером 500 п. н. было обнаружено исключительно в генотипах, у которых высокий уровень содержания γ -декалактона [8].

Наиболее перспективными для селекции по признаку «аромат плодов» формами являются генотипы, совмещающие в геноме несколько генов аромата. Исходя из результатов молекулярно-генетического анализа, в анализируемой коллекции 154 генотипов земляники сочетание активной аллельной формы гена *FaOMT* и функционального аллеля гена *FaFAD1* выявлено у 21,4% (табл. 2).

Следует отметить сорта земляники садовой, совмещающие функциональный аллель гена

FaFAD1 с гомозиготным состоянием активной аллельной формы гена *FaOMT* — Alba, Antea, Brilla, Dahli, Destiny, Flair, Hademar, Honey, Hansalola, Korona, Limalexia, Olympia и др., а также сорта, характеризующиеся сочетанием функционального аллеля гена *FaFAD1* с гетерозиготным состоянием гена *FaOMT* — Elsanta, Eva, Geneva, Renaissance, Rubis des Jardins, Scala, Купчиха, Садовый рубин.

Исследования по изучению генов аромата земляники проводились в Англии, Испании и США. Там были созданы праймеры для идентификации генов *FaOMT* и *FaFAD1* [4, 6, 8]. В последние годы похожая научная работа проводилась в Федеральном научном центре им. И. В. Мичурина на 43 разных сортах и дикорастущих видах земляники, по

Таблица 2

Аллельный состав генов *FaOMT* и *FaFAD1* в исследуемых сортах земляники садовой

Генотип	Количество, %	Сорта
<i>FaOMT</i> +/ <i>FaFAD1</i> +	21,4	Alba, Antea, Brilla, Flavia, Flair, Hademar, Hansalola, Holiday, Honey, Elly, Dahli, Destiny, Joly, Korona, Limalexia, Olympia, Onda, Onega, Osiris, Pegasus, Pircinque, Salsa, Sapore, Sonata, Tecla, Tea, Vicoda, Rima Tarda, Verona, Барокко, Вега, Классика, Торпеда
<i>FaOMT</i> +/ <i>FaFAD1</i> +	5,2	Elsanta, Eva, Geneva, Renaissance, Rubis des Jardins, Scala, Купчиха, Садовый рубин
<i>FaOMT</i> -/ <i>FaFAD1</i> +	2,6	Gemil, Gigantella Maxim, Веснянка, Тарпо
<i>FaOMT</i> +/ <i>FaFAD1</i> -	50,6	Allegro, Anabelle, Anais, Argentera, Asia, Bianca fregola, Candiss, Carmen, Charlotte, Cory, Crapo 10, Cambridge, Elianny, Fenella, Fernando, Flaminia, Florida Beauty, Fronteras, Fragolaurea, Hiku, Kent, Lia Sugar, Lord, Lycia, Magnus, Malling Allure, Malling Centenary, Malwina, Marmolada, Monterey, Murano, Naiad, Nandi, Pink Flamingos, Polka, Princess Diana, Queen Elizabeth 2, Quicky, San Andreas, Sandy, Sibilla, Sincerely, Sirius, Sweet Ann, Sunsation, Susy, Talia, Tecla, Tethis, Toros, Vivara, Viktoriana, Багряная, Вырицкая, Гелиос, 7.19–17/2 (Готика), Гренада, Дукат, Загадка, Кокинская заря, Красный берег, Мишутка, Московский деликатес, Полли, Польшина, Присвята, Ремонтантная розовая, Рубиновый кулон, Соловушка, Спасская, Студенческая, Татиус, Троицкая, Ударница, Фейерверк, Фестивальная, Царица
<i>FaOMT</i> +/ <i>FaFAD1</i> -	13,7	Aura, Dely, Chandler, Garigoùtte «Neuve», Cristina, Orly, Premy, Roxana, Sandra, Laura, Богота, Витязь, Дивная, Кокинская ранняя, Красная капелька, Россинка, Славутич, Слононок, Сударушка, Сюрприз Олимпиаде, Юния Смайде
<i>FaOMT</i> -/ <i>FaFAD1</i> -	6,5	Aprica, Braiton, Elvira, Emi, Clery, Rania, Vima Rina, Жемчужница, Лакомка, Найдена добрая

результатам анализа было выделено 16,3% наиболее перспективных генотипов для селекции на аромат плодов: Red Gauntlet, Marshall, Sonata, Tokado, Vima Tarda и дикорастущие виды *F. orientalis* Los., *F. moschata* Duch. [3].

Высокая точность прогнозирования присутствия этих важных летучих веществ делает генетический анализ эффективным инструментом для его внедрения в селекционные программы земляники для отбора новых сортов, перспективных для селекции.

Заключение

В результате проведенного молекулярно-генетического анализа из 154 сортов земляники были выделены наиболее перспективные генотипы для селекции на качество плодов, которые совмещают гомозиготное состояние активной аллельной формы гена *FaOMT* с функциональным аллелем гена *FaFAD1* и могут служить комплексными источниками высокого содержания мезифурана и γ -декалактона в плодах: Alba, Antea, Brilla, Dahli, Destiny, Elly, Flair, Flavia, Hademar, Hansalola, Honey, Holiday, Joly, Korona, Limalexia, Olympia, Onda, Onega, Osiris, Pegasus, Pircinque, Salsa, Sapore, Sonata, Tea, Tecla, Vicoda, Vima Tarda, Verona, Барокко, Вега, Классика, Торпеда.

Высокое содержание мезифурана в ягодах земляники можно прогнозировать у 72% из 154 проанализированных сортов: Allegro, Asia, Vivara, Candiss, Marmolada, Malling Allure, Charlotte, Mariguette, 7.19–17/2 (Готика), Кокинская заря, Татиус, Троицкая и др., характеризующихся гомозиготным состоянием функционального аллеля (генотип *FaOMT+FaOMT+*).

Потенциальными источниками высокого содержания γ -декалактона в плодах могут быть сорта Alba, Elly, Flair, Hademar, Vima Tarda, Sapore, Gemil, Osiris, Sonata, Барокко, Классика и др., характеризующиеся наличием гена *FaFAD1*, которые в общем составляют 29,2% из 154 проанализированных генотипов.

Список использованных источников

1. Продовольственная и сельскохозяйственная статистика [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://faostat.fao.org>. – Дата доступа: 18.09.2023.
2. Genetic analysis of Methyl anthranilate, mesifurane, linalool and other flavor compounds in cultivated strawberry *Fragaria* × *ananassa* / C. R. Barbey [et al.] // Front Plant Sci. – 2021. – Vol. 12. – P. 1–16.
3. Лыжин, А. С. Полиморфизм сортов и дикорастущих видов земляники генетической коллекции Федерального научного центра им. И. В. Мичурина по генам аромата плодов *FaOMT* и *FaFAD1* / А. С. Лыжин, И. В. Лукьянчук, Е. В. Жбанова // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2020. – Т. 24, № 1. – С. 5–11.
4. Validation of a PCR test to predict the presence of flavor volatiles mesifurane and γ -decalactone in fruits of cultivated strawberry (*Fragaria* × *ananassa*) / E. Cruz-Rus [et al.] // Mol. Breed. – 2017. – Vol. 37, № 10. – P. 131.
5. Rey-Serra, P. Inheritance of esters and other volatile compounds responsible for the fruity aroma in strawberry / P. Rey-Serra, M. Mnejja, A. Monfort // Front Plant Sci. – 2022. – Vol. 13. – P. 1–14.
6. Genetic analysis of strawberry fruit aroma and identification of O-methyltransferase *FaOMT* as the locus controlling natural variation in mesifurane content / Y. Zorrilla-Fontanesi [et al.] // Plant Physiological. – 2012. – Vol. 159, № 2. – P. 851–870.
7. Deciphering gamma-decalactone biosynthesis in strawberry fruit using a combination of genetic mapping, RNA-Seq and eQTL analyses / J.F. Sánchez-Sevilla [et al.] // BMC Genomics. – 2014. – Vol. 15, № 1. – P. 218.
8. Identification of a strawberry flavor gene candidate using an integrated genetic-genomic-analytical chemistry approach / A. H. Chambers [et al.] // BMC Genomics. – 2014. – Vol. 15, № 1. – P. 217.

E. M. Kulik, T. N. Kamedzko, R. M. Pugachev

MOLECULAR GENETIC ANALYSIS OF GARDEN STRAWBERRY VARIETIES BY *FaOMT* AND *FaFAD1* FRUIT AROMA GENES

Educational Institution
“Belarusian State Agricultural Academy”
5 Michurin St., 213410 Gorki, the Republic of Belarus
e-mail: ekaterinakulik113@gmail.com

The results of a molecular genetic analysis of 154 garden strawberry varieties of different origin by the genes that control fruit aroma are presented. The genetic analysis was carried out by two aroma genes: *FaOMT*, which controls mesifuran content and is localized in the distal region of the long arm of chromosome VII-F.1; and *FaFAD1*, which is responsible for the synthesis of γ -decalactone and is localized in the distal region of the long arm of chromosome III2 of the *F* × *ananassa* Duch genome. The *FaOMT*-SI/NO marker allows distinguishing between active and inactive allelic forms of the *FaOMT* gene based on their amplification size, 248 and 217 bp respectively. The *FaFAD1* marker identifies a 500 bp fragment, but it does not distinguish between dominant homozygous and heterozygous lines. An active allelic form of the *FaOMT* gene was identified in 90.9% of 154 strawberry varieties analyzed, while an inactive allelic form was found in 28% of the samples. The *FaFAD1* gene was identified in 29.2% of genotypes. Strawberry varieties that combine the functional allele of the *FaFAD1* gene with the homozygous state of an active allelic form of the *FaOMT* gene, and varieties that are characterized by a combination of the functional allele of the *FaFAD1* gene with the heterozygous state of the *FaOMT* gene were identified. As a result of the study conducted, the most promising fruit aroma genotypes were identified for breeding, combining both aroma genes in their genome (*FaOMT*⁺ and *FaFAD1*): Alba, Antea, Brilla, Dahli, Destiny, Flair, Hademar, Honey, Hansalola, Joly, Korona, Limalexia, Olympia, Osiris, Pircinque, Salsa, Sapore, Sonata, Tea, Vicoda, Vima Tarda, Barocco, Classic and Torpeda.

Keywords: fruit aroma, strawberries, varieties, mesifuran, γ -decalactone, molecular genetic analysis.

Дата поступления в редакцию: 28 января 2024 г.

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

ТЕСТИРОВАНИЕ КОММЕРЧЕСКИХ НАБОРОВ И МЕТОДОВ ВЫДЕЛЕНИЯ ДНК ДЛЯ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ ПЫЛЬЦЫ РАСТЕНИЙ

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

Дана оценка эффективности некоторых коммерческих наборов и классических методов выделения нуклеиновых кислот для получения качественных образцов ДНК, выделяемых из пыльцы растений. По результатам оценки качественных и количественных параметров образцов ДНК с помощью спектрофотометрии, флуориметрии и ПЦР-РВ сделаны выводы об эффективности использования коммерческих наборов и классических методов для выделения ДНК из пыльцы растений. Сравнительный анализ результатов, полученных для различных видов растений, позволяет сделать заключение об эффективности того или иного коммерческого набора. Установлена высокая эффективность классического метода фенол-хлороформной экстракции и некоторых коммерческих наборов (Machery-Nagel NucleoSpin Food Kit, PrepFiler BTA Forensic DNA Extraction Kit, ReliaPrep™ FFPE gDNA Miniprep System) для выделения ДНК из пыльцы растений.

Ключевые слова: ДНК пыльцы, выделение ДНК, ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ), палинология, судебная экспертиза.

Введение

Совокупность пыльцы, которая в значительном количестве присутствует в воздухе, оседая на поверхности, образует сложную смесь пыльцевых зерен — «пыльцевой след». Установление качественной и количественной характеристики «пыльцевого следа» может предоставить необходимую информацию, которая применима в разных областях, включая судебную палинологию. Однако ограничения классической палинологии не дают в полной мере воспользоваться информацией, которую скрывает в себе пыльцевая смесь. По этой причине идея использовать молекулярно-генетические методы исследования пыльцы в качестве альтернативы или дополнения к световой микроскопии появились у разных исследователей [1–6].

Выделение качественной ДНК является одним из наиболее важных аспектов при проведении молекулярно-генетических исследований, от которого будет зависеть дальнейший

результат. Большинство растительных тканей считаются сложными объектами для выделения образца ДНК как по качественным показателям (ratio 260/280 и 260/230 нм), так и по количеству выделенной нуклеиновой кислоты. Содержание значительных количеств вторичных метаболитов, таких как фенолы, полисахариды, пигменты, и низкое содержание ДНК может препятствовать реакции ПЦР или заметно снижать ее эффективность.

В настоящее время не ясно, насколько сопоставимы различные методы экстракции, поскольку морфологическое строение внешней оболочки пыльцы, ее химический состав, содержание вторичных метаболитов в клетке и на ее поверхности у различных видов растений сильно отличается, что может оказывать значительное влияние на результат выделения ДНК по причине неполного лизиса клеток или частичного удаления ингибирующих веществ [4]. Стандартизированный и эффективный метод выделения ДНК пыльцы обе-

спечит сопоставимость результатов палинологических исследований [6].

В настоящее время нет специфических коммерческих наборов для выделения ДНК из пыльцевых зерен, однако для выделения ДНК из пыльцы некоторые исследователи использовали следующие коммерческие наборы: Machery-Nagel NucleoSpin Food Kit [1, 3, 4, 5, 7], Qiagen DNeasy Plant Mini Kit [1, 4, 8], DNeasy Tissue Kit (Qiagen GmbH) [9], QIAamp DNA Mini Kit [10], MP Biomedicals FastDNA SPIN [3] и др.

Цель данной работы — изучить эффективности коммерческих наборов и классических методов экстракции нуклеиновых кислот для выделения ДНК из пыльцы разных видов растений и отбор наиболее пригодных из них.

Материалы и методы

Для оценки эффективности исследуемых коммерческих наборов и классических методов выделения нуклеиновых кислот (фенол-хлороформная экстракция и сорбция на силикагеле в суспензии) был сформирован план работ, который включал следующие этапы:

1. Выделение ДНК согласно протоколам производителей коммерческих наборов и описанным в научной литературе подходам [11].

2. Измерение концентрации ДНК с использованием спектрофотометрии (качественная характеристика образцов — соотношения 260/230 и 260/280) и флуориметрии (количественная характеристика образцов, измерение концентрации двуспиральной нативной ДНК, являющейся основой для начальных циклов ПЦР);

3. Нормализация концентрации двуспиральной нативной ДНК для всей совокупности исследуемых образцов (концентрация была стандартизована до 1 нг/мкл) и проведение первой ПЦР-РВ для определения порогового цикла *C_t*. Основная задача данного этапа — сравнить усредненное значение *C_t* для десяти биологических видов (перечислены ниже) для всех анализируемых коммерческих наборов и классических методов выделения нуклеиновых кислот. На данном этапе были рассчитаны среднее значение *C_t* и его стандартное отклонение, на основании чего был сделан вывод о пригодности того или иного набора/подхода для выделения ДНК для молекулярно-генетических исследований пыльцы растений в целом.

4. Проведение второй ПЦР-РВ для определения порогового цикла *C_t* к 30-му циклу на серии разведений ДНК, измеренной с использованием флуориметра. Данный цикл был выбран в качестве порогового в связи с тем, что на более поздних циклах ПЦР возрастает вероятность образования неспецифических ампликонов и артефактов. Основная задача данного этапа — определить минимальное количество двуспиральной нативной ДНК, достаточное для получения целевого ампликона.

5. Классификация исследуемых коммерческих наборов и классических методов выделения нуклеиновых кислот по эффективности для выделения ДНК с целью молекулярно-генетических исследований пыльцы растений.

В исследовании использовали 10 образцов пыльцы, собранных с различных видов растений, которые произрастали на территории г. Минска и Минской обл.: клен ясенелистный (*Acer negundo*), береза повислая (*Betula pendula*), дуб черешчатый (*Quercus robur*), сосна горная (*Pinus mugo*), ель обыкновенная (*Picea omorika*), одуванчик лекарственный (*Taraxacum officinale*), каштан конский обыкновенный (*Aesculus hippocastanum*), тюльпан гибридный (*Tulipa hybrida*), кукуруза сахарная (*Zea mays*) и можжевельник обыкновенный (*Juniperus communis*). Видовой состав образцов пыльцы был выбран исходя из значительной распространенности данных растений, систематической принадлежности и их хозяйственного значения на территории Республики Беларусь. Пыльца различных видов растений исследовалась для оценки универсальности методов выделения ДНК, учитывая особенности морфологического строения наружной оболочки.

В зависимости от вида пыльцы навески варьировали по массе от 2,55 до 10,90 мг. В пределах вида повторности имели одинаковую массу (табл. 1). Измерения навесок проводились на аналитических весах Radwag AS/C/2/N 82/220 (Польша), дискретность которых составляет 0,01 мг.

Для выделения ДНК из исследуемых образцов использовали 13 коммерческих наборов и два классических метода выделения ДНК (фенол-хлороформная экстракция и сорбция на силикагеле), широко применяемых в судебной биологической экспертизе. Краткая харак-

Таблица 1

Масса навесок пыльцевого материала в каждой исследуемой пробе в зависимости от вида растений и предполагаемые размеры продуктов ПЦР

Вид образца	Масса навески пыльцы (мг/образец)	Размеры ампликона 18S рРНК	GenBank
<i>Acer negundo</i>	5,83	245	U89909.1
<i>Betula pendula</i>	9,86	249	FJ011777.1
<i>Quercus robur</i>	4,22	218	AF098424.1
<i>Pinus mugo</i>	5,56	259	KR052986.1
<i>Picea omorika</i>	4,67	197	AJ243166.1
<i>Taraxacum officinale</i>	2,55	281	AJ633290.1
<i>Aesculus hippocastanum</i>	3,50	212	MK341794.1
<i>Tulipa hybrida</i>	7,56	197	HF952962.1
<i>Zea mays</i>	10,90	244	U46617.1
<i>Juniperus communis</i>	5,98	265	LC420950.1

характеристика наборов и методов приведена в таблице 2. Коммерческие наборы отбирались по нескольким принципам: упоминание в научных публикациях об их использовании для выделения ДНК из пыльцы; предусмотренная производителем возможность выделения ДНК из растительных тканей или объектов судебной криминалистической экспертизы; частота

применения в экспертных исследованиях; доступность к приобретению на момент проведения эксперимента.

Для классических методов выделения ДНК использовали лизирующий буфер на основе SDS (10mM трис-HCl; 10mM ЭДТА; 100 mM NaCl; 2% SDS) с добавлением 20 мкл 1M DDT на образец. При выделении фенол-хлороформ-

Таблица 2

Краткая характеристика коммерческих наборов и классических методов выделения ДНК

№ способа	Название набора / каталожный № / производитель	Характеристика набора / метода	Способ сорбции нуклеиновых кислот
1	АртДНК MiniSpin эксперт / VEMS / АртБиоТех (Беларусь)	Предназначен для выделения ДНК из образцов, содержащих малое количество ДНК, а также с высоким содержанием ДНК животного, растительного и микробного происхождения	Мембрана на основе диоксида кремния
2	Фенол-хлороформная экстракция	Выделение ДНК из широкого спектра образцов различного происхождения	Спиртовое осаждение ДНК
3	АртДНК / VD / АртБиоТех (Беларусь)	Универсальный набор, применимый для экстракции ДНК из тканей животных и человека, растительного сырья, продуктов питания, биологических добавок, кормов и других биологических образцов	Связывание ДНК с силикатными сорбентами
4	«Нуклеосорб» комплектация «С» / 005с.2 / Праймтех (Беларусь)	Набор предназначен для выделения ДНК из гомогенизированных тканей, а также из пищевых продуктов, биологических добавок, кормов для животных или растительного сырья	Связывание ДНК с силикатными сорбентами
5	GeneJET Plant Genomic DNA Purification Kit / K0792 / Thermo Fisher Scientific (США)	Набор предназначен для очистки геномной ДНК разных типов тканей и видов растений	Мембрана на основе диоксида кремния

Окончание таблицы 2

№ способа	Название набора / каталожный № / производитель	Характеристика набора / метода	Способ сорбции нуклеиновых кислот
6	LumiPure from AnySample для выделения геномной ДНК универсальный / 11573 / Lumiprobe (Россия)	Набор предназначен для быстрого и высокоэффективного выделения геномной ДНК из широкого спектра биологических образцов, в том числе тканей растений	Мембрана на основе диоксида кремния
7	PrepFiler BTA Forensic DNA Extraction Kit / 4463352 / Thermo Fisher Scientific (США)	Набор разработан для извлечения ДНК из кальцинированных тканей	Магнитные частицы
8	PrepFiler™ Forensic DNA Extraction Kit / 4463351 / Thermo Fisher Scientific (США)	Набор разработан для извлечения ДНК из большинства типов судебно-медицинских образцов как обычных, так и сложных	Магнитные частицы
9	QIAamp DNA Investigator Kit / 56504 / QIAGEN (Германия)	Набор предназначен для выделения геномной ДНК из широкого спектра образцов судебно-медицинской экспертизы	Мембрана на основе диоксида кремния
10	Machery-Nagel NucleoSpin Food Kit / 740945.50 / Macherey-nagel (Германия)	Набор предназначен для получения высококачественной геномной ДНК из пищевых продуктов и кормов	Мембрана на основе диоксида кремния
11	Plant DNA Preparation – Solution Kit / PP-207 / Jena Bioscience (Германия)	Набор разработан для удобного и быстрого выделения геномной ДНК из растительной ткани	Спиртовое осаждение ДНК
12	MasterPure-Complete DNA & RNA Purification Kit / MC89010 / Lucigen (США)	Набор предназначен для выделения высокомолекулярной геномной ДНК из различных типов образцов	Спиртовое осаждение ДНК
13	ReliaPrep™ FFPE gDNA Miniprep System / A2351 / Promega (США)	Набор разработан для очистки геномной ДНК из фиксированных в формалине тканей, пропитанных парафином	Мембрана на основе диоксида кремния
14	Выделение с помощью силикагеля в суспензии / S5631-100G / Honeywell (США)	Предназначен для выделения ДНК из лизата широкого спектра образцов [11]	Связывание ДНК с силикатными сорбентами
15	Genomic DNA Purification Kit / K0512 / Thermo Fisher Scientific (США)	Набор предназначен для выделения ДНК из бактерий, клеток, растений, крови	Спиртовое осаждение

ным методом фенол добавляли к лизирующей пыльце за 1 ч до основного этапа выделения и оставляли на термошейкере при температуре окружающей среды. Выделение ДНК с помощью силикагеля (метод № 14) проводили согласно описанной в литературе методике [11].

Каждым набором была выделена ДНК из 10 образцов пыльцы, которые происходили от разных видов растений. Объем элюата во всех случаях был одинаков (50 мкл).

Измерение концентрации выделенных об-

разцов ДНК проводили с помощью спектрофотометра DS-11 (Denovix, США) и флуориметра Quantus (Promega, США). ПЦР проводили с помощью амплификатора QuantStudio 5 (Thermo Scientific, США) при следующих условиях: 95 °C — 5 мин, 40 циклов: 95 °C — 15 сек, 60 °C — 60 сек. В качестве ПЦР-смеси использовали мастер-микс ArtMix Low ДНК-полимераза (АртБиоТех, Беларусь) с интеркалирующим красителем EvaGreen PCR-379 (Jena Bioscience, Германия). Итоговая концентрация

праймеров в смеси — 0,2 пмоль/мкл, общий объем ПЦР-смеси составлял 20 мкл. Каждая ПЦР проводилась в двух повторностях, оценка специфичности ПЦР проводилась на этапе плавления ампликонов.

Поскольку эффективность ПЦР варьирует в зависимости от праймеров и матрицы, эффективность комбинации праймер-матрица оценивается в эксперименте по титрованию с последовательными разведениями ДНК-матрицы для создания стандартной кривой, отражающей изменения *C_t* при каждом разведении.

В ПЦР-РВ использовали праймеры *18S* [12]. Праймеры *18S* синтезированы к участку рибосомальной *18S* рРНК, которая входит в состав малой субъединицы рибосом эукариот и является основным компонентом всех эукариотических клеток. Более того, участок *18S* находится вблизи *ITS*-региона, который является одним из наиболее часто используемых ДНК-штрихкодов растений. Размеры ампликонов (табл. 1), которые образованы используемыми маркерами, были установлены с помощью NCBI Primer BLAST. Размер получаемых продуктов был сопоставим между собой для всех исследуемых видов, что дает возможность проводить сравнительное исследование.

Результаты и обсуждение

Концентрации образцов ДНК, измеренные методом спектрофотометрии, находились в диапазоне от 6,23 до 581,55 нг/мкл в зависимости от используемого набора. Значения концентраций, близкие к пороговым для применяемого спектрофотометра, имеют высокую погрешность, что отражается на точности измерения. То же самое касается показателей чистоты препарата, определяемых по отношению поглощения волны при 260/230 и 260/280 нм. Если концентрация ДНК при измерении на спектрофотометре составляет <20 нг/мкл, то возможны погрешности в измерении показателей отношения 260/230 и 260/280 [13]. Показатель отношения 260/280 был оптимальным у 8 из 15 вариантов выделения, а отношение 260/230 находилось в оптимальной зоне только для набора Machery-Nagel NucleoSpin Food Kit (№ 10) (табл. 3).

Абсолютные значения результатов флуориметрии были заметно ниже, чем при исполь-

зовании спектрофотометрии, и составляли от 0,78 до 44,2 нг/мкл (табл. 3). Флуорофор связывается только с двухцепочечной ДНК, поэтому измерение концентрации на флуориметре более корректно, т. к. не учитываются сильно деградированные молекулы ДНК и примеси вторичных метаболитов со схожей длиной поглощения волны. Наиболее высокие значения концентрации ДНК, измеренные с помощью флуориметра, были получены при выделении пыльцы фенол-хлороформной экстракцией (№ 2) и наборами QIAamp DNA Investigator Kit (№ 9) и MasterPure-Complete DNA & RNA Purification Kit (№ 12), а наименьшие — при использовании наборов АртДНК MiniSpin эксперт (№ 1), GeneJET Plant Genomic DNA Purification Kit (№ 5) и LumiPure from AnySample (№ 6). Результаты измерения концентрации выделенной ДНК на спектрофотометре и флуориметре скоррелированы, $R = 0,918$ ($p < 0,01$).

Высокие значения стандартного отклонения, характерные для измерения концентраций по каждому способу, объясняются тем, что выделялись навески пыльцы, принадлежащие к разным видам. В этой связи анализировались значения медианы и процентилей (25, 75%), поскольку наблюдалось распределение, не соответствующее нормальному для полученных результатов.

Измерение концентрации ДНК при помощи ПЦР-РВ позволяет оценить эффективную концентрацию ДНК, которая учитывает только те фрагменты ДНК, которые пригодны для ПЦР — неповрежденные цепи достаточной длины. Эффективная концентрация ДНК может отличаться от концентраций, измеренных спектро- и флуориметрически. С одной стороны, в ПЦР могут вступать и одноцепочечные фрагменты, с другой стороны, наличие примесей, особенно фенольной природы, оказывает ингибирующее действие на ПЦР [14]. Количество ДНК в образце оценивается по минимальному числу циклов амплификации исследуемого локуса, превышающему пороговое значение. Низкое значение порогового числа циклов (*C_t*) может указывать на высокий уровень содержания целевой ДНК в образце. Если значение *C_t* оказывается больше 30 циклов, возрастает вероятность неспецифической амплификации.

Таблица 3

Показатели концентраций ДНК, измеренные на спектрофотометре и флуориметре, и Ct для маркеров 18S в зависимости от способов выделения для 10 видов

№ способа выделения (табл. 1)	Среднее значение отношения 260/280*	Среднее значение отношения 260/230**	Средняя концентрация ДНК, нг/мкл (флуориметр)	Среднее количество ДНК, нг	Медианное значение концентрации ДНК, (нг/мкл) при анализе на флуориметре [25–75%]	Среднее Ct 18S с стандартным отклонением (SD)
1	1,92	0,40	0,89	44,5	0,82 [0,16–1,37]	16,33 ± 5,03
2	1,88	1,14	43,05	2 152,5	47,25 [16,38–65,75]	18,24 ± 9,05
3	1,36	0,83	4,17	208,5	1,41 [0,40–4,64]	16,10 ± 4,25
4	2,28	0,04	5,97	298,5	3,25 [1,13–6,63]	15,41 ± 5,13
5	3,30	0,96	0,78	39,0	0,97 [0,08–1,35]	16,61 ± 3,7
6	2,98	0,56	0,91	45,5	0,17 [0,04–2,13]	17,73 ± 2,95
7	1,99	0,93	23,76	1 188,0	16,75 [7,85–44,13]	14,81 ± 4,91
8	2,05	0,93	28,42	1 421,0	21,00 [9,84–44,13]	15,56 ± 4,14
9	2,34	1,03	44,20	2 210,0	29,00 [2,45–86]	16,86 ± 4,05
10	2,11	1,95	25,90	1 295,0	42,00 [4,97–111,25]	17,19 ± 5,26
11	1,99	1,44	24,45	1 222,5	18,82 [7,38–36,95]	18,06 ± 3,76
12	2,15	1,39	30,52	1 526,0	18,24 [3,59–47,32]	20,16 ± 3,82
13	1,80	0,53	8,74	437,0	2,22 [0,3–10,19]	13,69 ± 3,83
14	2,29	0,52	9,76	488,0	4,36 [2,13–13,83]	17,75 ± 4,21
15	0,76	0,29	2,40	120,0	0,42 [0,17–2,80]	22,26 ± 5,04

Примечание. полужирным шрифтом выделены наилучшие значения показателей; * — оптимальное соотношение 260/280 находится в диапазоне 1,8–2,2; ** — оптимальное соотношение 260/230 должно быть больше 1,8

Наилучшие значения показателя Ct (табл. 3) наблюдались для наборов «Нуклеосорб» комплектации «С» (№ 4), PrepFiler BTA Forensic DNA Extraction Kit (№ 7), PrepFiler™ Forensic DNA Extraction Kit (№ 8), ReliaPrep™ FFPE gDNA Miniprep System (№ 13), а наихудшие — для метода выделения фенол-хлороформная экстракция (№ 2) и наборов Plant DNA Preparation – Solution Kit (№ 11), MasterPure-Complete DNA & RNA Purification Kit (№ 12), Genomic DNA Purification Kit (№ 15). К интерпретации Ct стоит подходить осторожно, поскольку его значение зависит от большого количества факторов. Например, ингибирование ПЦР может происходить из-за внесения большого количества матрицы

ДНК в ПЦР-смесь, что, возможно, и наблюдается для метода выделения фенол-хлороформная экстракция (№ 2) и наборов Plant DNA Preparation – Solution Kit (№ 11), MasterPure-Complete DNA & RNA Purification Kit (№ 12), поскольку ранее были установлены высокие значения концентраций ДНК для данных методов/наборов. С другой стороны, наборы, показавшие наилучшие значения, возможно, позволяют выделить оптимальное количество чистой ДНК для проведения ПЦР без дополнительной пробоподготовки.

Для определения эффективной концентрации ДНК для каждого способа выделения (табл. 2) было выполнено три этапа последовательных разведений ДНК (1/3, 1/9, 1/27). Та-

ким образом, было подготовлено 450 образцов для ПЦР-РВ. Отсутствие продукта амплификации наблюдалось в 60% случаев для образцов без разведения и при разведениях 1/3, выделенных фенол-хлороформным методом (№ 2). Увеличение разведения до 1/9 снижало количество «неудачных» ПЦР до 10%, а при разведении 1/27 ПЦР продукт появлялся во всех образцах, что может указывать на ингибирование ПЦР большим количеством ДНК. По этой причине для фенол-хлороформного метода была выполнена еще одна серия разведения (1/81, 1/243, 1/729, 1/2 187), в которой целевой ПЦР продукт присутствовал во всех образцах, что подтверждает предположение об ингибировании реакции большим количеством ДНК и позволило достоверно построить стандартную кривую. Неполное удаление ингибиторов ПЦР для данного метода не критично, поскольку обязательное разведение образца выделенной ДНК приведет не только к снижению ее концентрации, но и ингибиторов, что положительно скажется на протекании ПЦР. Ингибирование ПЦР избыточным количеством ДНК характерно и для наборов QIAamp DNA Investigator Kit (№ 9), Machery-Nagel NucleoSpin Food Kit (№ 10), но было выражено заметно слабее и проявлялось в завышении Ct при амплификации неразведенных образцов, что может указывать на более высокие значения показателей чистоты выделенной ДНК по сравнению с фенол-хлороформным методом (№ 2).

Подход к количественному определению ДНК с помощью ПЦР-РВ основан на построении графика зависимости флуоресценции от

числа циклов в логарифмической шкале [15]. По графикам линейной регрессии (рис. 1), построенным на основании зависимости порогового значения Ct от разведений образцов ДНК, определены уравнения прямой, значения R² и количество ДНК для Ct 30 (табл. 4)

Среди исследуемых образцов минимальное количество ДНК, которое должно вноситься в ПЦР-смесь для получения стабильного результата, было отмечено у ReliaPrep™ FFPE gDNA Miniprep System (№ 13), QIAamp DNA Investigator Kit (№ 9) и фенол-хлороформной экстракции (№ 2). Для большинства методов/наборов количество ДНК в ПЦР для Ct 30 было в диапазоне 0,0234–0,1888 нг, за исключением выделения ДНК с использованием MasterPure-Complete DNA & RNA Purification Kit (№ 12), силикагеля (№ 14) и Genomic DNA Purification Kit (№ 15). Полученные результаты указывают на сильное влияние выбранного варианта для выделения, отношение по вносимой ДНК худшего подхода к лучшему составило 53,94. Таким образом, влияние на эффективность выделения оказывается через лизис клеточной стенки, эффективное избавление лизата от вторичных метаболитов и максимальное сохранение молекулы ДНК.

Образцы всех наборов имели относительно небольшие эффективные количества ДНК, способные амплифицировать целевой продукт, а риск получения неспецифического продукта был минимален. Таким образом, несмотря на значительные различия между наборами, все они могли бы использоваться для выделения ДНК из пылицы при необходимости. По значению коэффициента детерминации (R²)

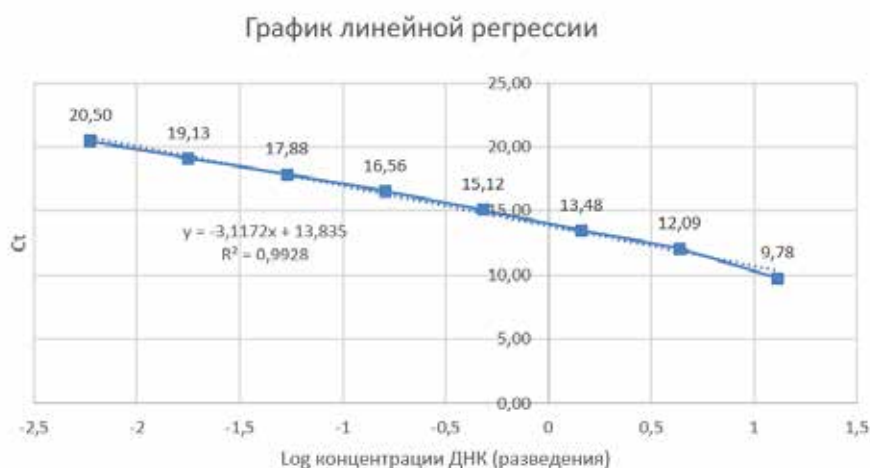


Рис. 1. График линейной регрессии одного из образцов, выделенного фенол-хлороформной экстракцией

Таблица 4

Значения R^2 и количество ДНК для Ct 30 по серии разведений образцов ДНК

№ способа выделения (табл. 1)	Значение R^2	Среднее значение k	Расчетное значение количества ДНК (нг) для Ct 30
1	0,9938	-3,1517	0,0268
2	0,953	-2,0893	0,0130
3	0,9672	-2,6279	0,0186
4	0,9643	-2,8282	0,0298
5	0,9711	-3,3446	0,0466
6	0,9782	-2,9260	0,0234
7	0,9566	-2,6215	0,0527
8	0,9459	-3,9914	0,1168
9	0,9538	-1,8670	0,0095
10	0,9173	-2,1271	0,0286
11	0,9714	-3,2535	0,1888
12	0,9508	-3,2287	0,3560
13	0,9457	-2,2819	0,0066
14	0,9253	-5,2448	0,2671
15	0,9715	-4,0676	0,2109

можно судить о достоверности полученных результатов. В нашем исследовании разведения всех образцов имели значения R^2 , близкие к «1», что свидетельствует о корректности полученных данных.

ДНК, выделенная из пыльцы, будет использоваться для дальнейшего исследования с помощью секвенирования, поэтому оптимальным будет тот способ выделения, образцы ДНК которого будут успешно амплифицироваться в широком диапазоне концентраций. Общее уравнение построенных прямых имеет вид $y = k \times x + b$, где k — угловой коэффициент, равный тангенсу угла, образованного данной прямой к оси X. Значение k (табл. 4), отражающее угол наклона калибровочной прямой к оси X, демонстрирует характер изменения показателя Ct в зависимости от концентрации образца, т. е. характеризует устойчивость ПЦР к разведению, которая будет снижаться при ухудшении качества матрицы или ее слишком низкой концентрации в исследуемом образце.

Нами определен перечень критериев, на основании которых определены лучшие способы выделения ДНК для молекулярно-генетических исследований пыльцы растений:

– соотношение 260/280 (2 балла, если значение находится в диапазоне 1,8–2,2; 0 баллов, если значение ≤ 1 или ≥ 3 ; 1 балл — все остальные случаи);

– соотношение 260/230 (1 балл, если значение $\geq 1,8$; 0 баллов — все остальные случаи);

– коэффициент k (2 балла, если значение $\geq 2,8$; 0 баллов, если значение $\leq -3,9$; 1 балл все остальные случаи).

Результаты классификации представлены в таблице 5.

Таким образом, все исследуемые способы выделения, исходя из количества баллов, можно разделить на три группы:

– высокоэффективные (4–5 балла): Machery-Nagel NucleoSpin Food Kit (№ 10), ReliaPrep™ FFPE gDNA Miniprep System (№ 13), PrepFiler BTA Forensic DNA Extraction Kit (№ 7), фенол-хлороформная экстракция (№ 2);

– наборы, проявившие среднюю эффективность (3 балла): АртДНК (№ 3), «Нуклеосорб» (№ 4), QIAamp DNA Investigator Kit (№ 9), Plant DNA Preparation – Solution Kit (№ 11), MasterPure-Complete DNA & RNA Purification Kit (№ 12);

– низкоэффективные (≤ 2 баллов): LumiPure

Таблица 5

Бальная классификация способов выделения ДНК для молекулярно-генетических исследований пыльцы растений

№ способа выделения	260/280	Балл	260/230	Балл	Коэффициент к	Балл	Сумма баллов
1	1,92	2	0,40	0	-3,1517	1	3
2	1,88	2	1,14	0	-2,0893	2	4
3	1,36	1	0,83	0	-2,6279	2	3
4	2,28	1	0,04	0	-2,8282	2	3
5	3,30	0	0,96	0	-3,3446	1	1
6	2,98	1	0,56	0	-2,9260	1	2
7	1,99	2	0,93	0	-2,6215	2	4
8	2,05	2	0,93	0	-3,9914	0	2
9	2,34	1	1,03	0	-1,8670	2	3
10	2,11	2	1,95	1	-2,1271	2	5
11	1,99	2	1,44	0	-3,2535	1	3
12	2,15	2	1,39	0	-3,2287	1	3
13	1,80	2	0,53	0	-2,2819	2	4
14	2,29	1	0,52	0	-5,2448	0	1
15	0,76	0	0,29	0	-4,0676	0	0

from AnySample (№ 6), PrepFiler™ Forensic DNA Extraction Kit (№ 8), GeneJET Plant Genomic DNA Purification Kit (№ 5), выделение с помощью силикагеля (№ 14), Genomic DNA Purification Kit (№ 15).

Заключение

По результатам проделанной работы можно сделать несколько основных выводов:

1. Выбранный способ экстракции оказывает сильное влияние на эффективность выделения ДНК.

2. При необходимости выделить максимально чистый (отношения 260/230 и 260/280 — 1,95 и 2,11 соответственно) образец ДНК из пыльцы с минимальной пробоподготовкой, наилучшим способом выделения будет использование набора Machery-Nagel NucleoSpin Food Kit.

3. Фенол-хлороформная экстракция позволяет выделить значительное количество ДНК, данный метод продемонстрировал свою эффективность в эксперименте с разведениями ДНК, а также высокие значения концентрации выделенной ДНК при измерении как спектро-

фотометром, так и флуориметром. Таким образом, фенол-хлороформный метод подтвердил свое звание «золотого стандарта» для выделения ДНК. В то же время фенол-хлороформный способ выделения ДНК потребует дополнительного этапа исследования, связанного с поэтапным разведением образцов для успешного проведения ПЦР. Основным недостатком при выделении ДНК фенол-хлороформным методом является использование токсичных веществ, применение которых в судебно-экспертных лабораториях стараются при возможности минимизировать.

4. Для молекулярно-генетических исследований пыльцы растений не рекомендуется использовать наборы для выделения ДНК LumiPure from AnySample, PrepFiler™ Forensic DNA Extraction Kit, GeneJET Plant Genomic DNA Purification Kit, Genomic DNA Purification Kit, т. к. они показали низкую эффективность при молекулярно-генетических исследованиях пыльцы растений.

Работа выполнена при финансовой поддержке Белорусского республиканского фон-

да фундаментальных исследований, грант № Б22М-068.

Список использованных источников

1. A DNA Barcoding Approach to Characterize Pollen Collected by Honeybees / A. Galimberti [et al.] // PLoS ONE. – 2014. – Vol. 9, № 10. – P. e109363.
2. A DNA barcoding approach to identify plant species in multiflower honey / I. Bruni [et al.] // Food Chemistry. – 2015. – Vol. 170 – P. 308–315.
3. Applying Pollen DNA Metabarcoding to the Study of Plant–Pollinator Interactions / K. L. Bell [et al.] // Applications in Plant Sciences. – 2017. – Vol. 5, № 6. – P. 1600124.
4. Detection of airborne genetically modified maize pollen by real-time PCR / S. Folloni [et al.] // Molecular Ecology Resources. – 2012. – Vol. 12, № 5. – P. 810–821.
5. 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.
6. Pollen DNA barcoding: current applications and future prospects / K. L. Bell [et al.] // Genome. – 2016. – Vol. 59. – P. 629–640. – DOI: 10.1139/gen-2015-02002016
7. Evaluating multiplexed next-generation sequencing as a method in palynology for mixed pollen samples / A. Keller [et al.] // Plant Biol J. – 2015. – Vol. 17, № 2. – P. 558–566.
8. 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. – DOI:10.1371/journal.pone.0134735
9. Valentini, A. DNA Barcoding for Honey Biodiversity / A. Valentini, C. Miquel, P. Taberlet // Diversity. – 2010. – Vol. 2, № 4. – P. 610–617.
10. 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.
11. Boom, R. Rapid and simple method for purification of nucleic acids / R. Boom [et al.] // Journal of Clinical Microbiology. – 1990. – Vol. 28, № 3. – P. 495–503.
12. Molecular aspects of Anthocyanin fruit tomato in relation to high pigment-1 / M. Sapir [et al.] // J Hered. – 2008. – Vol. 99, № 3. – P. 292–303. – DOI: 10.1093/jhered/esm128
13. Koetsier, G. A practical guide to analyzing nucleic acid concentration and purity with microvolume spectrophotometers / G. Koetsier, E. Cantor // New England Biolabs Technical Note. – 2019. – Vol. 7. – P. 1–8.
14. Балановский, О. П. Методы измерения концентрации ДНК: совпадение относительных величин и различия абсолютных / О. П. Балановский, Ж. А. Кагазежева, М. В. Олькова // ВЕСТНИК РГМУ. – 2019, № 3. – С. 27–33.
15. Carr, A. C. Robust quantification of polymerase chain reactions using global fitting / A. C. Carr, S. D. Moore // PLoS ONE. – 2012. – Vol. 7, № 5. – P. e37640.

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

TESTING OF COMMERCIAL KITS AND DNA ISOLATION METHODS FOR MOLECULAR GENETIC STUDIES OF PLANT POLLEN

¹State Scientific Institution

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

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

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

²State Institution

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

25 Filimonova St., 220114 Minsk, the Republic of Belarus

The effectiveness of some commercial kits and the classical methods of nucleic acid isolation for obtaining high-quality DNA samples isolated from plant pollen was evaluated. Based on the evaluation results of the qualitative and quantitative parameters of DNA samples using spectrophotometry, fluorimetry and real-time PCR, conclusions were drawn about the effectiveness of using commercial kits and classical methods for DNA isolation from plant pollen. A comparative analysis of the results obtained for different plant species allows us to conclude about the effectiveness of a particular commercial set and the principle of isolation depending on the species of pollen grains. The high efficiency of the classical method of phenol-chloroform extraction and some commercial kits (Machery-Nagel NucleoSpin Food Kit, QIAamp DNA Investigator Kit, ReliaPrep™ FFPE gDNA Miniprep System) for DNA extraction from plant pollen was established.

Keywords: pollen DNA, DNA isolation, real-time PCR, palynology, forensic examination.

Дата поступления в редакцию: 30 января 2024 г.

О. Э. Соловей, Е. Э. Хейдорова, К. В. Гомель, М. Е. Никифоров

ФИЛОГЕОГРАФИЧЕСКОЕ ПОЛОЖЕНИЕ БЕЛОРУССКОЙ ПОПУЛЯЦИИ ЕВРАЗИЙСКОГО БОБРА *CASTOR FIBER* L. КАК ОТРАЖЕНИЕ ЕЕ ПРОИСХОЖДЕНИЯ

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

На основании анализа 43 нуклеотидных последовательностей митохондриального гена *cyt b* евразийского бобра из 42 административных районов всех областей Беларуси показано, что современное филогеографическое положение белорусской популяции данного вида может быть следствием ее смешанного происхождения от двух филогрупп (генетических линий) ($F_{ST} = 0,98$; $p < 0,05$). Показано, что западная линия имеет большую представленность на территории страны и встречается во всех бассейновых популяциях бобра. Восточная линия распространена менее равномерно, в основном на северо-востоке и юго-западе Беларуси. По маркеру *cyt b* мтДНК отличий между бассейновыми популяциями бобра выявлено не было.

Ключевые слова: евразийский бобр, *Castor fiber*, филогенетические связи, популяция, филогеография, *cyt b*, филогруппа.

Введение

Жизнедеятельность евразийского бобра (*Castor fiber* L.) играет существенную роль в преобразовании среды и интенсивных сукцессионных процессах в экосистемах [1]. В охотничьем хозяйстве ресурсы этого вида эксплуатируются достаточно интенсивно, ежегодное изъятие его составляет порядка 5–10 тыс. особей. Действующий в настоящее время План управления популяцией бобра [2] нацелен на обеспечение жизнеспособности данного вида для его устойчивого использования, что в общепринятой мировой практике включает, среди прочих мероприятий, задачи по оценке генетического разнообразия, структуры и уровня инбридинга [3].

Исторический ареал евразийского бобра охватывал территорию от Британских островов до Восточной Сибири, где он был многочисленным и успешным с биологической точки зрения видом. Однако на рубеже XIX–XX вв. численность мировой популяции *Castor fiber* достигла критически низких значений в разных точках ареала, что привело к снижению ее генетического разнообразия [4–7]. Оставшиеся представители вида оказались сосредоточены в восьми сильно

изолированных реликтовых популяциях, получивших на основании морфометрических параметров [8, 9] статус подвидовых. Так, примерно 30 особей *C. f. galliae* сохранилось вдоль реки Роны во Франции, 200 особей *C. f. albicus* — вдоль реки Эльбы в Германии, 100 особей *C. f. fiber* — на юге Норвегии, не более 300 особей *C. f. belorussicus* — вдоль реки Нёман и притоков Днепра в Беларуси и в Украине, 70 особей *C. f. orientoeuropaes* — вдоль реки Дон (Воронеж) в России, 300 особей *C. f. pohlei* — вдоль реки Конда и Сосьва в Западной Сибири, 30–40 особей *C. f. tuvinicus* — вдоль реки Верхний Енисей в Тувинских горах Средней Сибири и, предположительно, меньше 100–150 особей *C. f. birulai* — вдоль реки Урунгу в Китае [10]. Считается, что именно эти реликтовые популяции являются исходными для современной евразийской популяции вида [11].

Таким образом, в начале XX в. общая численность евразийского бобра в Европе оценивалась в 1 200 особей, причем наиболее крупные группировки сохранились на территории Беларуси. Тем не менее и здесь вид находился на грани полного исчезновения, что, в свою очередь, должно было привести

к уменьшению генетического разнообразия и утрате редких генетических линий. В 1924 г. экспедицией под руководством А. В. Федюшина обнаружено, что в верхнем течении реки Березины и ее притоках находится крупнейшая колония *Castor fiber* в европейской части СССР из известных на тот момент [8]. Строгий запрет на добычу бобров, организация резерватов и масштабное расселение спасли вид от полного исчезновения [12].

Расселение бобров по всей территории СССР происходило в период с 1934 по 1965 г. В качестве племенного материала для транслокаций использовали белорусских и воронежских бобров, а с 1948 г. ключевым источником племенного материала стала Беларусь [13]. Бобры воронежского и белорусского происхождения дали основу для восстановления популяций вида не только на территории бывшего Советского Союза, но и в странах Западной и Северной Европы [14]. Так, в период с 1956 по 1977 г. в систему рек Рейн (Швейцария) были выпущены бобры из Франции, Скандинавии и России [15]. В период с 1966 г. бобры смешанного географического происхождения Франции, Скандинавии, Польши и бывшего Советского Союза были выпущены в реку Дунай (Бавария, Германия) [16]. С 1976 по 1990 г. бобры из Польши, Беларуси и Швеции выпускались в бассейне Дуная к востоку от Вены [17]. Таким образом, исследование генетического разнообразия белорусской популяции евразийского бобра представляет интерес не только в контексте совершенствования управления его ресурсами, но и в силу значимости как носителя наиболее полноценного сохранившегося генофонда вида.

Вопрос о степени родства между популяциями евразийского бобра с использованием молекулярно-генетических данных впервые был рассмотрен в 2005 г. [6, 7]. Выявленные на основе контрольного региона мтДНК монофилетические клады отражали разделение мировой популяции бобра на две филогруппы: восточную и западную, которые классифицируют как эволюционно значимые единицы в соответствии с критериями С. Moritz [18]. К западной филогруппе были отнесены популяции бобра из Франции, Германии и Скандинавии, к восточной — из Польши, Литвы, России и Монголии. Более поздние исследова-

ния, основанные в том числе на анализе SNP, показали, что разделение между восточной и западной филогруппами не так однозначно, и реципрокная монофилия могла быть нарушена [19]. Вероятным объяснением является то, что расхождение линий мтДНК бобра возникло в результате отступления популяций в ледниковые рефугиумы во время последнего ледникового максимума, однако последующая интрогрессия указанных генетических линий, происходившая предположительно в Восточной Европе в результате вторичного контакта популяций, привела к их смешению. Данное предположение косвенно подтверждается тем, что на основе анализа древней ДНК выявлено наличие зоны контакта между восточной и западной линиями бобра в прошлом на территории, соответствующей современной Польше [20, 21].

Генетическое разнообразие белорусской части мировой популяции бобров в исследованиях зарубежных авторов изучено не полно, полученные отрывочные данные требуют уточнения на выборках большего территориального и временного охвата. В целом же, основное внимание в изучении бобра на территории Беларуси уделялось внутривидовым морфо-экологическим особенностям. Известно, что метапопуляционная структура бобра формировалась постепенно, вследствие территориальной разобщенности и инсуляризации в отдельных речных бассейнах [4]. В разные периоды исследователи указывали на существование трех (нёманской, сожской и березинской [14]) и семи (березинской, сожской, западнобугской, западнодвинской, нёманской, припятской и днепровской [22, 23]) географических популяций данного вида, выделяемых на основе морфометрических показателей и экологических особенностей. Отсутствие подтверждения дифференциации субпопуляций на генетическом уровне и запутанная генеалогия в период массовой реинтродукции и транслокаций делает актуальной целью настоящей работы по установлению места современного белорусского бобра в общей филогеографической структуре мировой популяции.

Материалы и методы

Образцы мышечной ткани 43 особей ев-

разийского бобра собраны на территории 42 административных районов всех областей Беларуси в период с 2016 по 2023 г. Образцы были

условно разделены на группы в соответствии с семью бассейновыми популяциями, согласно литературным источникам [22, 23] (рис. 1).

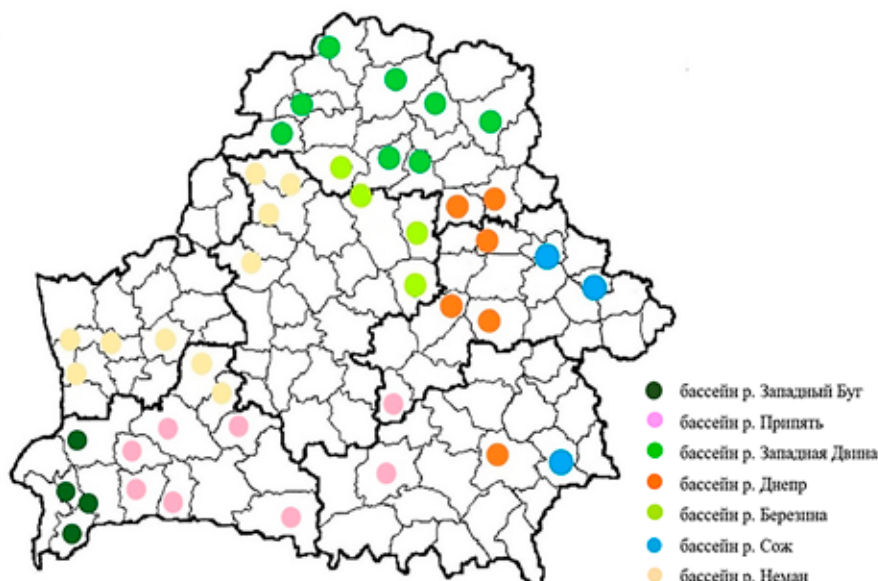


Рис. 1. Распределение точек сбора образцов биоматериала евразийского бобра из различных бассейновых популяций

Для выделения ДНК использовали набор «Animal and Fungi DNA Preparation Kit» (Jena Bioscience, Германия) в соответствии с протоколом производителя. Качественные и количественные показатели полученных препаратов ДНК определяли с помощью наноспектрофотометра NanoPhotometer P 330UV/Vis (IMPLEN, Германия).

Для оценки гаплотипического разнообразия использовался фрагмент *cyt b* митохондриального генома, для амплификации которого была использована пара праймеров L7 и H6, предложенных Durka с соавторами [7], и следующая реакционная смесь финальным объемом в 25 мкл: 10x ПЦР-буфер на основе сульфата аммония (Thermo Scientific) — 2,5 мкл; 10x смесь дНТФ (Праймтех) — 2,5 мкл; *Taq*-полимераза (Праймтех) — 0,1 мкл (концентрация 5 ед./мкл); $MgCl_2$ (Праймтех) — 1,5 мкл (концентрация 50 мМ); прямой праймер — 2,0 мкл (концентрация 5 пмоль/мкл); обратный праймер — 2,0 мкл (концентрация 5 пмоль/мкл); ДНК-матрица — 2 мкл; mQ вода (доведение объема реакционной смеси до 25 мкл). Амплификацию проводили на термоциклере Bio-rad C1000 Touch (США) при следующих температурных условиях: предварительная

денатурация при 94 °С 4 мин; 35 циклов в режиме: денатурация (94 °С, 30 сек), отжиг (58 °С, 30 сек) и элонгация (72 °С, 70 сек); окончательная элонгация (72 °С, 7 мин). Полученные ампликоны визуализировали методом гель-электрофореза в 1,5%-ом агарозном геле с использованием камеры MiniGel длиной 15 см (Bio-rad, США) и системы документации геля Gel Doc™ XR+ (Bio-rad, США).

Реакции секвенирования проводили с использованием набора BrilliantDye3.1 (Nimagen, Нидерланды). Каждый образец анализировался с помощью прямого праймера. Сиквенс-продукты очищали методом precipitation в растворе этанол/ЭДТА. Последующее разделение сиквенс-продуктов проводили на генетическом анализаторе ABI3130 (в качестве полимера использовался POP7 polymer) в Институте биоорганической химии НАН Беларуси. Выравнивание полученных нуклеотидных последовательностей по алгоритму ClustalW, выбор модели филогенетических построений и построение дендрограммы осуществляли в MEGA X [24]. С помощью программы Fabox (1.61) анализируемые сиквенсы были объединены в гаплотипы. Для сравнительного анализа использовали выборку из

17 последовательностей *cyt b* мтДНК из Германии, Франции, Польши/Литвы, Норвегии, Республики Тува и Западной Сибири, загруженных из базы данных NCBI. В качестве внешней группы привлечены последовательности *cyt b* *Castor canadensis* (NC_033912.1, KY311838.1).

Параметры генетического разнообразия (число полиморфных сайтов (S), среднее число нуклеотидных различий (k), число гаплотипов (h), гаплотипическое разнообразие (Hd), нуклеотидное разнообразие (π)) рассчитывали в программе DnaSP 6.12.01 [25]. Гипотезу о расширении популяции проверяли посредством расчета демографических статистик

Fu's Fs и теста Tajima's D в Arlequin ver. 3.1 [26]. Расчет индекса дифференциации F_{ST} между филогруппами бобра для популяции вида из Беларуси также осуществляли в программе Arlequin ver. 3.1.

Результаты и обсуждение

В результате анализа 43 последовательностей *cyt b* мтДНК длиной 375 п. н. консервативными оказались 99,7% сайтов. Нуклеотидная последовательность содержит два полиморфных и одновременно парсимониально информативных сайта. Генетические характеристики популяции евразийского бобра из Беларуси представлены в таблице 1.

Таблица 1

Данные по генетическому разнообразию и демографии популяции *Castor fiber* в Беларуси

Параметр	Значение
n	43
h	2
k	0,62
Hd \pm SD	0,31 \pm 0,072
π \pm SD	0,00165 \pm 0,00087
Fu's Fs	2,34 (ns)
Tajima's D	0,632(ns)

Примечание. n — число последовательностей, h — число гаплотипов, k — среднее число нуклеотидных различий, Hd — гаплотипическое разнообразие, π — нуклеотидное разнообразие, SD — стандартное отклонение, Fu's Fs, Tajima's D — популяционно-демографические статистики, ns — статистически не достоверно

Из данных таблицы 1 следует, что для исследованной выборки бобра не установлено свидетельств событий демографического роста либо резкого падения численности на основании статистик Fu's Fs и Tajima's D. Всего обнаружено два гаплотипа со средним числом нуклеотидных различий, равным 0,62. Анализ филогенетического дерева, построенного на основе совместной выборки евразийского бобра из Беларуси и Европы с использованием митохондриального маркера *cyt b* (рис. 2) с длиной выравненной последовательности, равной 306 п. н., продемонстрировал разделение всех гаплотипов на два основных кластера с высокой поддержкой бутстрепа и значением индекса $F_{ST} = 0,98$ ($p < 0,05$) [27], что согласуется с ранее упомянутыми сведениями о разделе-

нии мировой популяции бобра на восточную и западную филогруппы [7]. При этом наиболее представленным оказался гаплотип западной линии haplotype 1 с частотой встречаемости 81,4% (35 последовательностей), к гаплотипу восточной линии haplotype 2 относилось восемь последовательностей (18,6% выборки).

Идентичность haplotype 1 с последовательностями *cyt b* *C.f. galliae* и *C.f. albicus* и haplotype 2 — с *C.f. tuvinicus* и *C.f. birulai*, свидетельствует о существовании значительной связи между реликтовыми популяциями в прошлом и общности источника происхождения современных популяций бобра. Так, образец AF155879.1 баварского происхождения объединяется в общий гаплотип с образ-



Рис. 2. Дендрограмма гаплотипов *cyt b* митохондриальной ДНК бобра в ареале (эволюционная модель Kimura-2-parameter-model, $\text{IV} = 500$). Розовым блоком выделена западная филогруппа, голубым блоком — восточная филогруппа. Гаплотипы, отмеченные в Беларуси, показаны синим шрифтом

цами белорусского бобра, что, по-видимому, объясняется историей реинтродукции бобров из Швеции, Финляндии, Франции, Польши и бывшего Советского Союза по притокам реки Дунай [5, 19].

Различия между двумя филогруппами могли сформироваться в условиях географической изоляции популяций в рефугиумах в течение последнего ледникового периода и впоследствии закрепиться в период выраженного снижения численности вида, что привело к потере промежуточных генетических линий и падению генетического разнообразия [7, 20]. Наличие в Беларуси двух генетических линий (западной и восточной) может быть следствием нахождения нашей территории в зоне вторичного контакта данных линий еще до событий резкого сокращения численности вида.

Таким образом, характер распределения гаплотипов *cyt b* мтДНК на дендрограмме отражает генетическую структурирован-

ность и смешанный характер происхождения белорусской популяции данного вида. При анализе географического распределения филогрупп бобра по территории Беларуси (рис. 3) установлен его неравномерный характер. Гаплотип западной линии haplotype 1 широко распространен во всех бассейновых субпопуляциях, а гаплотип восточной линии haplotype 2 представлен только в популяциях рек Западный Буг, Неман, Западная Двина, Припять (правый приток).

Для более полного установления различий бассейновых субпопуляций и их вклада в формирование белорусской метапопуляции бобра требуется продолжение исследований с увеличением выборки и применением дополнительных митохондриальных и ядерных маркеров.

Увеличение выборки для расширения анализа по гену *cyt b*, на наш взгляд, является нецелесообразным, т. к. позволит выявить наличие редких гаплотипов, однако не изменит харак-

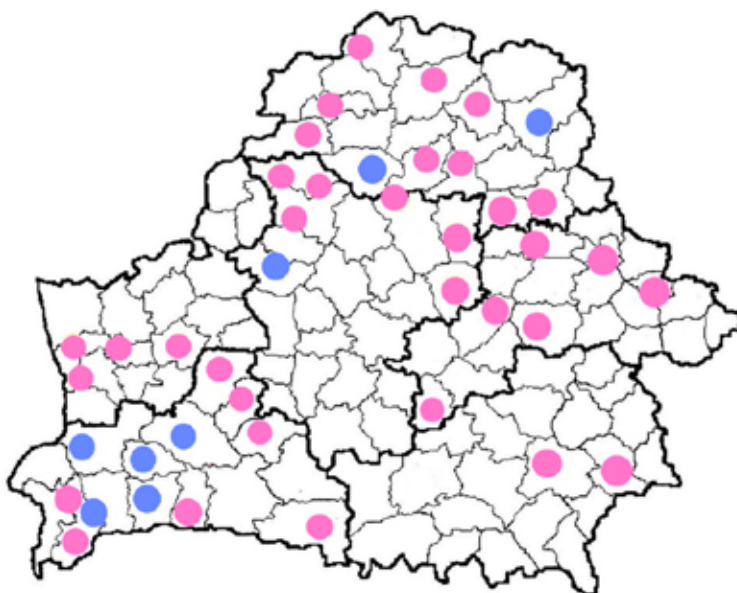


Рис. 3. Карта распределения образцов бобра из Беларуси согласно их принадлежности к западной (розовый цвет) или восточной (голубой цвет) филогруппам

тера структурированности популяции в целом в силу низкого уровня полиморфизма популяций бобра по данному маркеру.

Что касается использования в дальнейших исследованиях данных по другим митохондриальным локусам, то уже имеется некоторый аналитический задел, достигнутый зарубежными исследователями на основе анализа *D-loop*. Так, в генетических исследованиях, проведенных ранее [19], на нашей территории было выявлено три гаплотипа контрольного региона мтДНК, из которых к западной филогруппе относился гаплотип nh4 (одна особь), а к восточной — гаплотипы nh2 и nh5. Обнаруженный в работе воронежский гаплотип jf7 также может иметь белорусское происхождение, т. к. существует две точки зрения о происхождении воронежской популяции бобра. По одним данным, она сформирована исключительно потомками белорусских бобров, завезенными из Минской губернии в зверинец принцессы Ольденбургской и сбежавшими на волю в 1886 г. [28]. По другим — имеет генофонд, образованный от смешения белорусских бобров первой волны расселения (1934–1947 гг.) и аборигенных животных [4, 12, 28]. Кроме того, имеются сведения, что в число реинтродуцируемых по всей территории Беларуси бобров входило не менее 40% животных из воронежской популяции [4]. Поэтому очевидно, что белорусская и воронеж-

ская популяции должны иметь много общих генетических черт, что, однако, справедливо и для кировской популяции (Россия) ввиду ее происхождения в 1948 г. от бобров из Воронежа и Беларуси [12, 14, 28]. Из трех гаплотипов, обнаруженных в Кировской области (jf7, nh3 и nh4), гаплотипы jf7 и nh4 также были обнаружены в Воронеже и Беларуси (Витебская область) соответственно, а гаплотип nh3 отличался от nh4 только одной заменой [11, 19]. Исходя из приведенных данных, можно сделать вывод о предпочтительности проведения дальнейших исследований именно на основе контрольного региона мтДНК в силу большего полиморфизма данного региона и доступности накопленной информации с акцентом на увеличение объема выборки, территориального охвата, а также временного диапазона сбора образцов для установления полной картины и динамики генетического разнообразия белорусской популяции бобра. Существует также необходимость расширить начатые ранее исследования по ядерным локусам ДНК, в которых авторы сделали предположение, что бобры из бассейна Немана (Гродненская и Минская области) образуют единую группу, а родство бобров из Витебской и Гомельской областей (западная Двина и бассейн Днепра соответственно) требует дальнейшего изучения в связи с недостаточностью выборки и ограниченной территорией

исследования [11]. В другой работе, где на основе анализа девяти STR-локусов дана оценка генетического разнообразия белорусской популяции бобра и показан невысокий уровень внутривидового разнообразия исследованной выборки [29], использованы недостаточные и неравновесные по областям выборки без учета существования бассейновых популяций, а именно сравнение по речным бассейнам необходимо для выявления популяционной дифференциации и реликтовых популяций.

Заключение

Таким образом, анализ 43 нуклеотидных последовательностей митохондриального гена *сyt b* евразийского бобра из 42 административных районов всех областей Беларуси показал, что современное филогеографическое положение белорусской популяции может быть следствием ее смешанного происхождения от двух филогрупп в зоне их контакта еще до событий резкого сокращения численности вида. Западная линия имеет большую представленность на территории страны и встречается во всех бассейновых популяциях бобра. Восточная линия распространена менее равномерно, в основном на северо-востоке и юго-западе Беларуси. Об изначальном, еще до широко-масштабной кампании по расселению, существовании этих двух генетических линий свидетельствует их сильная генетическая дифференциация ($F_{ST} = 0,98$; $p < 0,05$). По маркеру *сyt b* мтДНК отличий между бассейновыми популяциями бобра выявлено не было. Для более полного установления различий бассейновых субпопуляций и их вклада в формирование белорусской метапопуляции бобра требуются дальнейшие исследования с увеличением выборки и применением дополнительных митохондриальных и ядерных маркеров.

Список использованных источников

1. Завьялов, Н. А. Средообразующая деятельность бобра: новые работы и гипотезы / Н. А. Завьялов // Исследования бобров в Евразии: сборник научных трудов / ГНУ ВНИИОЗ им. Проф. Б. М. Житкова РАСХН; сост. А. П. Савельев. – Киров, 2011. – Вып. 1. – С. 41–52.
2. План управления популяцией бобра в Республике Беларусь / В. В. Шакун [и др.]. – Минск: ГНПО «НПЦ НАН Беларуси по биоресурсам», 2021. – 21 с.
3. The Eurasian Beaver Handbook: Ecology and Management of *Castor fiber* / R. Campbell-Palmer [et al.]. – UK: Pelagic Publishing, 2016. – 202 p.
4. Кораблев, Н. П. Микроэволюционные процессы в популяциях транслоцированных видов: евроазиатский бобр, енотовидная собака, американская норка / Н. П. Кораблев, П. Н. Кораблев, М. П. Кораблев. – М.: Товарищество научных изданий КМК, 2018. – 402 с.
5. Kautenburger, R. Population genetic structure in natural and reintroduced beaver (*Castor fiber*) populations in Central Europe / R. Kautenburger, A. C. Sander // Animal Biodiversity and Conservation. – 2008. – Vol. 31 (2). – P. 25–35.
6. Genetic variation and population structure of the Eurasian beaver (*Castor fiber*) in Eastern Europe and Asia / J. F. Ducroz [et al.] // Journal of Mammalogy. – 2005. – Vol. 86 (6). – P. 1 059–1 067.
7. Mitochondrial phylogeography of the Eurasian beaver *Castor fiber* / W. Durka [et al.] // Molecular Ecology. – 2005. – Vol. 14. – P. 3 843–3 856.
8. Лавров, Л. С. Виды бобров (род *Castor*) Палеарктики / Л. С. Лавров // Зоол. Журнал. – 1979. – Т. 58, № 1. – С. 88–96.
9. Heidecke, D. Taxonomische Aspekte des Artenschutzes am Beispiel der Biber Eurasiens / D. Heidecke // Her-cynia N.F. Leipzig. – 1986. – Vol. 22. – P. 146–161.
10. Nolet, B. Comeback of the beaver *Castor fiber*: an overview of old and new conservation problems / B. Nolet, F. Rosell // Biological Conservation. – 1998. – Vol. 83, № 2. – P. 165–173.
11. Recovery in the melting pot: complex origins and restored genetic diversity in newly established Eurasian beaver (Rodentia: Castoridae) populations / P. Munclinger [et al.] // Biological Journal of the Linnean Society. – 2022. – Vol. 135. – P. 793–811.
12. Акклиматизация охотничье-промысловых зверей и птиц в СССР / М. П. Павлов [и др.]; под ред. И. Д. Кириса. – ВНИИ охотничьего хоз-ва и звероводства (ВНИИОЗ), 1973. – 535 с.
13. Жарков, И. В. Итоги расселения речных бобров в СССР / И. В. Жарков // Труды Воронежского государственного заповедника / Центрально-Чернозёмное кн. изд-во. – Воронеж, 1969. – С. 10–52.

14. Самусенко, Э. Г. Сходство и различия белорусских и воронежской популяций бобров / Э. Г. Самусенко, А. Н. Фоменков // Биологические основы освоения, реконструкции и охраны животного мира Белоруссии. – 1983. – С. 145–146.
15. Minnig, S. Genetic monitoring of Eurasian beaver (*Castor fiber*) in Switzerland and implications for the management of the species / S. Minnig, C. Angst, G. Jacob // Russian Journal of Theriology. – 2016. – Vol. 15. – № 1. – P. 20–27.
16. The Genetic Legacy of Multiple Beaver Reintroductions in Central Europe / C. Frosh [et al.] // PLoS ONE. – 2014. – Vol. 9, № 5. – P. 1–14.
17. Kropf, M., Genetic evidence on the origin of the current beaver (*Castor fiber*) population in Lower Austria / M. Kropf, G. Hölzler, R. Parz-Gollner // Šumarski list. – 2013. – Vol. 11–12, № CXXXVII. – P. 591–596.
18. Moritz, C. Defining "evolutionary significant units" for conservation / C. Moritz // Trends in Ecology & Evolution. – 1994 – Vol. 9. – P. 373–375.
19. Nuclear and mitochondrial genetic structure in the Eurasian beaver (*Castor fiber*) — implications for future / H. Senn [et al.] // Evolutionary Applications. – 2014. – Vol. 7. – P. 645–662.
20. Ancient mitochondrial DNA and the genetic history of Eurasian beaver (*Castor fiber*) in Europe / S. Horn [et al.] // Molecular ecology. – 2014. – Vol. 23. – P. 1 717–1 729.
21. Admixture of two phylogeographic lineages of the Eurasian beaver in Poland / A. Biedrzycka [et al.] // Mammalian Biology. – 2014. – Vol. 79. – P. 287–296.
22. Популяционная экология бобра: монография / В. Ф. Литвинов [и др.]. – Витебск: ВГАВМ, 2012. – 256 с.
23. Востоков, Е. К. Бобр в Беларуси во времени и пространстве / Е. К. Востоков. – Минск: СтройМедиаПроект, 2017. – 334 с.
24. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms / S. Kumar [et al.] // Molecular Biology and Evolution. – 2018. – Vol. 35, № 6. – P. 1 547–1 549.
25. DNA Sequence Polymorphism Analysis of Large Data Sets / J. Rozas [et al.] // Molecular Biology and Evolution. – 2017. – Vol. 34. – P. 3 299–3 302.
26. Excoffier, L. Arlequin (version 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis / L. Excoffier, G. Laval, S. Schneider // Evol Bioinform Online. – 2005. – Vol. 1. – P. 47–50.
27. Кузнецов, В. М. Оценка генетической дифференциации популяций молекулярным дисперсионным анализом (аналитический обзор) / В. М. Кузнецов // Аграрная наука Евро-Северо-Востока. – 2021. – № 22 (2). – С. 167–184.
28. Граве, Г. Л. Речной бобр в пределах СССР и его хозяйственное значение / Г. Л. Граве. – Ленинград: Сельколхозгиз, 1931. – 144 с.
29. Верчук, А. Н. Исследование микросателлитных ДНК-маркеров для идентификации особей бобра речного (*Castor fiber*) в криминалистических целях / А. Н. Верчук, Т. В. Осадчук // 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, 2023. – Т. 35. – С. 99–108.

O. E. Solovei, E. E. Kheidorova, K. V. Homel, M. E. Nikiforov

PHYLOGEOGRAPHIC LOCATION OF THE BELARUSIAN POPULATION OF THE EURASIAN BEAVER *CASTOR FIBER* L. AS A REFLECTION OF ITS ORIGIN

Scientific and Practical Center
of the National Academy of Sciences of Belarus for Bioresources
27 Akademicheskaya St., 220072 Minsk, the Republic of Belarus
e-mail: oksanka-verbitskaya@mail.ru

Based on the analysis of 43 nucleotide sequences of the mitochondrial gene *cyt b* of the Eurasian beaver from 42 administrative districts of all the Regions of Belarus, it was shown that the current phylogeographic location of the Belarusian population of this species may be a consequence of its mixed origin from two phylogroups (genetic lines) ($F_{ST} = 0.98$; $p < 0.05$). It was shown that the western line is highly represented throughout the country and is found in all basin beaver populations. The eastern line is distributed less evenly, mainly in the northeast and southwest of Belarus. There were no differences by the *cyt b* mtDNA marker between basin beaver populations.

Keywords: Eurasian beaver, *Castor fiber*, phylogenetic relationships, population, phylogeographic location, mitochondrial gene *cyt b*, phylogroup.

Дата поступления в редакцию: 07 февраля 2024 г.

А. А. Ланевич, Р. С. Шулинский, Ю. В. Бондаренко, Н. В. Воронова-Барте

ХАРАКТЕРИСТИКА ГЕНОВ СЕМЕЙСТВА АВС-ТРАНСПОРТЕРОВ, УЧАСТВУЮЩИХ В ПРОЦЕССЕ ДЕТОКСИКАЦИИ КСЕНОБИОТИКОВ, В ГЕНОМЕ ТЛИ *APHIS CRACCIVORA* КОСН, 1854

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

В ходе исследования была определена вариабельность и структура мультигенного семейства АВС-транспортёров у тли *Aphis craccivora* Koch, 1854, которая является опасным вредителем бобовых и пасленовых растений, активно культивируемых в Республике Беларусь. Впервые для исследуемой тли был секвенирован геном, произведена сборка и очистка прочтений; предсказаны, затем вручную проаннотированы гены АВС-транспортёров. Исследованы подсемейства генов — *ABCB*, *ABCC* и *ABCG*, продукты которых задействованы в процессе детоксикации инсектицидов.

Ключевые слова: АВС-транспортёры, детоксикация ксенобиотиков, вариабельность генов, тля.

Введение

Тли (*Hemiptera: Aphididae*) — широко распространенные фитофаги, насчитывающие более 4 300 описанных видов. Приблизительно 100 видов тлей являются экономически важными вредителями сельскохозяйственных растений. Одним из активно внедряющихся в агроэкосистему Республики Беларусь видов является *Aphis craccivora* — полифаг и вредитель бобовых и пасленовых растений [1].

В последние годы было показано, что у тлей АВС-транспортёры выводят из клетки молекулы не только трансформированных, но и нативных инсектицидов, обеспечивая тлям резистентный фенотип мульти-типа, причем экспрессия генов, кодирующих АТФ-связывающие транспортные белки, при контакте тлей с ксенобиотиком возрастает многократно [2], что вносит дополнительный вклад в формирование устойчивости. Роль АВС-транспортёров в процессе детоксикации ксенобиотиков у тлей известна. Например, было описано влияние такого инсектицида, как сульфоксафлор, применяемого для контроля против тли *Aphis gossypii* Glover, 1877, к которому она приобрела устойчивость. Сульфоксафлор является агонистом никотиновых ацетилхолиновых рецепторов насекомых (nAChR) и действует иначе, чем другие инсектициды, нацеленные на них. Другой инсектицид — ве-

рапамил, являющийся ингибитором семейства генов АВС, использовался для выяснения роли АВС-транспортёров в резистентности к сульфоксафлору. Повышение экспрессии АВС-транспортёров привело к повышенной детоксикации сульфоксафлора у *A. gossypii*, в то же время уровень экспрессии других АВС-транспортёров был снижен. Нокдаун генов *ABCA1* и *ABCD1* у хлопковых тлей значительно увеличивает их чувствительность к сульфоксафлору. Это подтверждает, что повышенная экспрессия этих генов может способствовать развитию резистентности к этому инсектициду [8]. Кроме того, эксперименты с РНК-интерференцией генов *ABCA2*, *ABCD1*, *ABCD2*, *ABCE1*, *ABCG15* и *ABCG24* показали, что они прямо влияют на восприимчивость насекомых к другому инсектициду — тиаметоксаму [9]. Наиболее часто оказывается задействовано подсемейство АВС-транспортёров *ABCG* в качестве белков, отвечающих за повышение устойчивости к тому или иному инсектициду. Например, к циантранилипролу — инсектициду на основе антранилового диамида второго поколения, широко используемого для борьбы с грызущими и сосущими вредителями, против которого, например, у тли *A. gossypii* отмечалась устойчивость за счет сверхэкспрессии генов *ABCG4*, *ABCG7*, *ABCG16*, *ABCG17*, *ABCG26*, а их подавление

повышало чувствительность штамма тлей к инсектициду [10]. В свою очередь, зеленая персиковая тля (*Myzus persicae*, Sulzer, 1776) выработала устойчивость по крайней мере к 70 различным синтетическим соединениям. В число задействованных белков в устойчивости входили и ABC-транспортеры [11].

Собственно, ABC-транспортеры — это суперсемейство мембранных белков, которые в организме насекомых участвуют в реализации множества разных функций, включая нейтрализацию токсичного действия ксенобиотиков: от синтетических инсектицидов до вторичных метаболитов растений [3]. В ABC-транспортерах выделяют домены: нуклеотид-связывающие (NBD — nucleotide binding domain) и трансмембранные (TMD — transmembrane domain). NBD отвечает за сам АТФ-механизм работы белков, а TMD — за транслокацию субстрата. Связывание с АТФ приводит к димеризации двух нуклеотид-связывающих доменов, а гидролиз АТФ — к их диссоциации. Предполагается, что эти структурные изменения цитоплазматических доменов передаются на трансмембранные сегменты. В результате происходят дальнейшие конформационные перестройки, за счет которых сайты связывания субстрата становятся доступными сначала на одной стороне мембраны, а затем на другой. Таким образом, ABC-транспортеры используют связывание и гидролиз АТФ для транспорта малых молекул через бислой [4].

Гены ABC обнаружены во многих различных организмах эукариот и характеризуются высокой степенью консервативности между разными видами. Это свидетельствует о том, что большинство из этих генов существует с самого начала эволюции эукариот. Они могут быть классифицированы на подсемейства, основываясь на структурном сходстве, последовательности доменов NBD и TMD, а также на порядке их расположения [5].

На основе сходства нуклеотидного состава и функции гены ABC-транспортеров классифицированы на восемь подсемейств в алфавитном порядке, начиная от ABCA до ABCH [3]. Продукты семейства генов ABC по структуре классифицируют как полные транспортеры (FT — full transporter), содержащие два TMD и два NBD, или полутранспортеры

(HT — half-transporter), содержащие по одному из каждого домена. Полные транспортеры экспрессируются в цитоплазматической мембране, тогда как полутранспортеры обычно находятся во внутриклеточных мембранах [6]. Полутранспортеры способны объединяться и образовывать функциональные белки. Также существуют ABC-транспортеры, которые не имеют TMD доменов — подсемейства ABCE и ABCF [7].

Целью данной работы было получение новых научно обоснованных данных о количестве, структуре и вариабельности генов, кодирующих ABC-транспортеры подсемейств B, C и G в геноме люцерновой тли (*Aphis craccivora*) — экстремального полифага и опасного инвайдера фауны Беларуси.

Материалы и методы

Для анализа вариабельности состава генов были использованы последовательности генов ABC-транспортеров тли *A. craccivora*. Для построения консенсусов были использованы последовательности генов ABC-транспортеров у других тлей: *Acyrtosiphon caraganae* Cholodkovsky, 1908; *Myzus cerasi* Fabricius, 1775; *Cinara cedri* Mimeur, 1936; *Macrosiphum albifrons* Essig, 1981; *Acyrtosiphon pisum* Harris, 1776; *Aphis gossypii* Glover, 1877; *Diuraphis noxia* Kurdjumov, 1913; *Sipha flava* Forbes, 1885; *Myzus persicae* Sulzer, 1776; *Rhopalaliphum maidis* Fitch, 1856. Предварительная обработка данных включала полногеномное секвенирование *A. craccivora*, которое было проведено на платформе MiSeq с использованием библиотеки TruSeq 350. При обработке прочтений были проведены оценка качества прочтений в FastQC [12] и тримминг некачественных оснований в Trimmomatic [13]. Фильтрация прочтений проводилась путем их картирования на все бактериальные геномы в программе Bowtie2 (sensitive local alignment) [14] с последующим отбором невыравненных прочтений. Вышеуказанные прочтения использовались в дальнейшей сборке в ассемблере AbySS2.0 [15]. Аннотация проводилась в пайплайне Maker [16]. Мы использовали итеративную стратегию обучения скрытых марковских моделей. Первым этапом являлось обучение скрытых в программе snar на моделях генов, полученных в результате

выравнивания EST. Далее предсказанные модели snar использовались для переобучения snar, а также обучения AUGUSTUS. В качестве самообучающегося HMM предиктора был выбран genemark. Финальные модели генов синтезировались как консенсусные с HMM предсказаний, а также EST и белковой гомологии в программе EvidenceModeler [17].

Идентификация генов *ABC* в геноме *A. craccivora* проводилась при помощи BLAST. Курирование аннотации целевых моделей генов проводили в геномном браузере Apollo [18], где вручную проводилась корректировка границ генов, основываясь на выравнивании последовательностей аннотируемого гена с найденными в blastx и blastn [19] с пороговым E-значением $1e^{-5}$. Эти поиски обычно идентифицировали только белки, принадлежащие к одному и тому же подсемейству, что указывает на высокую степень консервативности трансмембранных доменов между различными подсемействами белков *ABC* у тлей.

Загрузка нуклеотидных последовательностей осуществлялась в формате fasta в программу MEGA11 [20], затем проводилась оценка нуклеотидной композиции для каждого представителя ABC-транспортеров целевых подсемейств у *A. craccivora*. Поиск функциональных участков в генах был проведен посредством баз данных UniProt [21] и CDD (NCBI) [22]. В качестве функционального участка был взят мотив Walker A. В дальнейшем этот мотив использовался для построения консенсусов. Последовательность мотива Walker A сравнивалась у *A. craccivora* с последовательностями мотива целевых подсемейств у других видов тлей, ранее упомянутых.

Аминокислотные последовательности были проанализированы при помощи ТМНММ 2.0 — инструмента для предсказания транс-мембранных спиралей в белке [23], чтобы в дальнейшем определить структуру белка: полутранспортер (НТ) или полный транспортер (FT). Поиск мотивов осуществлялся посредством биоинформатического инструмента MEME [24], после чего найденные мотивы были проверены на наличие в известных базах данных при помощи онлайн-инструментов CD-search [25] и InterProScan [26]. Среди многокопийных генов отбирали варианты, которые имели наибольшую идентичность по

отношению к генам из базы данных нуклеотидов и белков NCBI.

Построение филогении осуществлялось с использованием программного пакета BEAST2 v.2.7 [27]. Для выравнивания последовательностей применяли алгоритм MUSCLE в программе MEGA11 [20], с назначенным штрафом за вставку пробелов $-2,6$. Предварительно была рассчитана модель эволюции аминокислотных последовательностей для построения филогении при помощи программы IQ-TREE 2 [28], и среди всех предложенных программой моделей была выбрана модель WAG. Длина MCMC составляла 1 млн с сохранением результатов каждого тысячного значения в log-файл с оценкой эффективного размера выборки (ESS) для всех параметров. В качестве модели ветвления применялась модель байесовского графика горизонта (Bayesian skyline plot). Филогенетическое дерево, основанное на апостериорной вероятности, построили в программе TreeAnnotator v.2.7 из вышеупомянутого пакета программ BEAST2 и визуализировали в программе FigTree v1.4.4 [29].

Результаты и обсуждение

В геноме *A. craccivora* найдено 52 гена, распознаваемых как ABC-транспортер, 16 из которых являлись частичными (partial) генами и которые в дальнейшем отсеивались и не анализировались.

Наиболее широко в геноме *A. craccivora* представлено подсемейство *G* — 32,9% от всего количества генов *ABC*. Нуклеотидный состав этих генов демонстрировал заметное смещение GC-состава (рис. 1).

Для подсемейства *ABCG* характерно преобладание в кодонах тимина и аденина, особенно ярко выражено это у генов *ABCG23* и *ABCG4*, с 10 и 5 копиями соответственно.

Высокое разнообразие и многокопийность генов подсемейства *ABCG* можно объяснить их чрезвычайно важной ролью в системе детоксикации вредных веществ. Количество этих генов велико не только среди артропод, но также и среди позвоночных, растений и грибов [2]. Таким образом, можно предположить, что для генов системы детоксикации эволюция идет не только по пути усиления экспрессии генов, кодирующих белки-транспортеры ве-

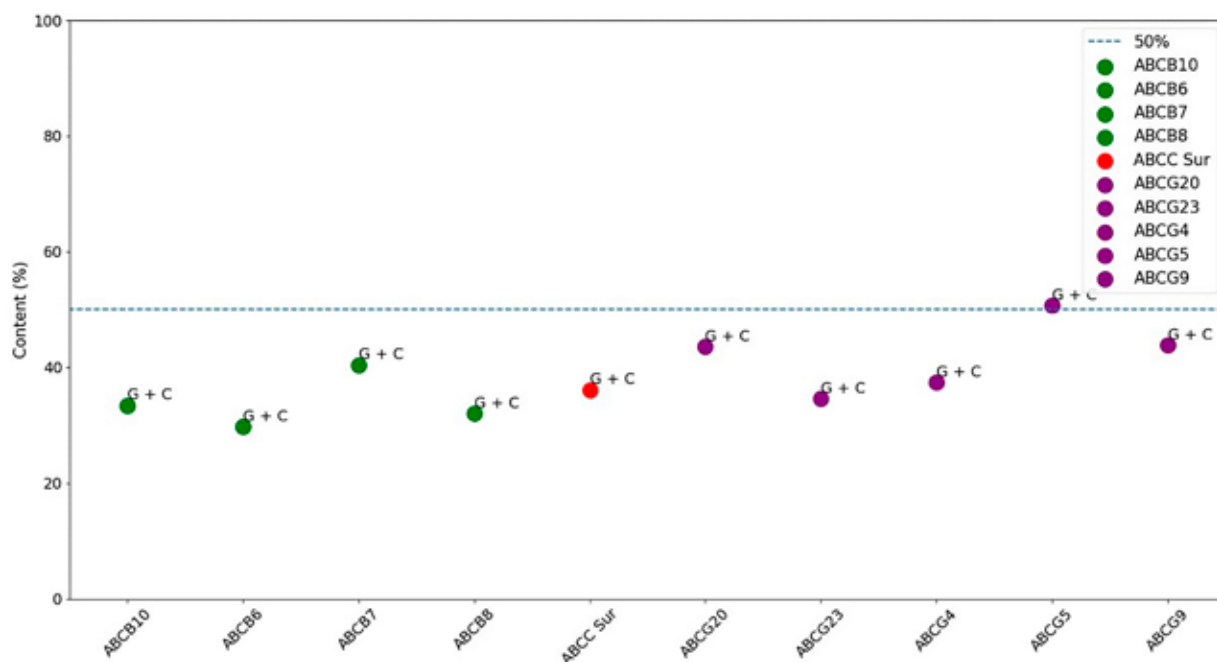


Рис. 1. GC-состав белок-кодирующего участка генов подсемейств B, C и G в геноме *A. craccivora*

ществ, но и по пути физического увеличения числа копий генов, кодирующих белки определенных семейств.

Что касается генов подсемейства *ABCB*, то в них также во всех позициях доминирует тимин и аденин, причем процентное содержание аденина в третьей позиции кодонов гена *ABCB10* достигает 41%, а содержание цитозина падает до 7,9%.

Подсемейство *ABCC*, которое представлено лишь одним геном, характеризуется отклонением ГЦ-состава и преобладанием тимина и аденина, особенно в третьей позиции в кодоне.

В генах ABC-транспортеров наблюдается тенденция в снижении частоты встречаемости гуанина и цитозина. Цитозин встречается реже других нуклеотидов, у всех изучаемых генов его содержание наименьшее.

В качестве функционального участка, по которому можно определить изменчивость генов *ABC*, был использован мотив Walker A (или Р-петля) нуклеотид-связывающего домена, на основе которого выявляют эволюционные отношения между представителями семейства *ABC* [6].

Мотив состоит из 24 нуклеотидов и различается по своему составу в зависимости от подсемейства и конкретного гена подсемейства. В целом у подсемейства *ABCG* отмечается низкая вариабельность этого участка (рис. 2). Стоит

отметить ген *ABCG8*, который, несмотря на низкую вариабельность, имеет иное нуклеотидное наполнение в консенсусе по сравнению с другими генами того же подсемейства. Наименьшее количество вариабельных позиций в мотиве Walker A характерно для генов *ABCG8*, наибольшее — для *ABCG1*.

Для подсемейств *ABCB* и *ABCC* также характерен высокий уровень нуклеотидного сходства (рис. 3), а количество вариабельных однонуклеотидных сайтов не превышает 7 из 24 нуклеотидов.

На основе имеющихся данных о том, что FT содержит два транс-мембранных домена, каждый из которых состоит из шести транс-мембранных спиралей, то есть в сумме 12, а НТ имеет один транс-мембранный домен, состоящий из шести транс-мембранных спиралей (ТМ) [7], у тли *A. craccivora* определялась топология белков, и на ее основе делался вывод о структуре отдельных белков ABC-транспортеров (табл. 1).

Белки подсемейства *ABCA* встречаются у эукариот в основном в виде FT. Среди *ABCB* встречаются обе структуры, однако для *A. craccivora* характерны только полутранспортеры. Представитель подсемейства *ABCC* встречается в виде одной копии и является полным транспортером. *ABCD* подсемейство обычно представлено в виде полутранспор-

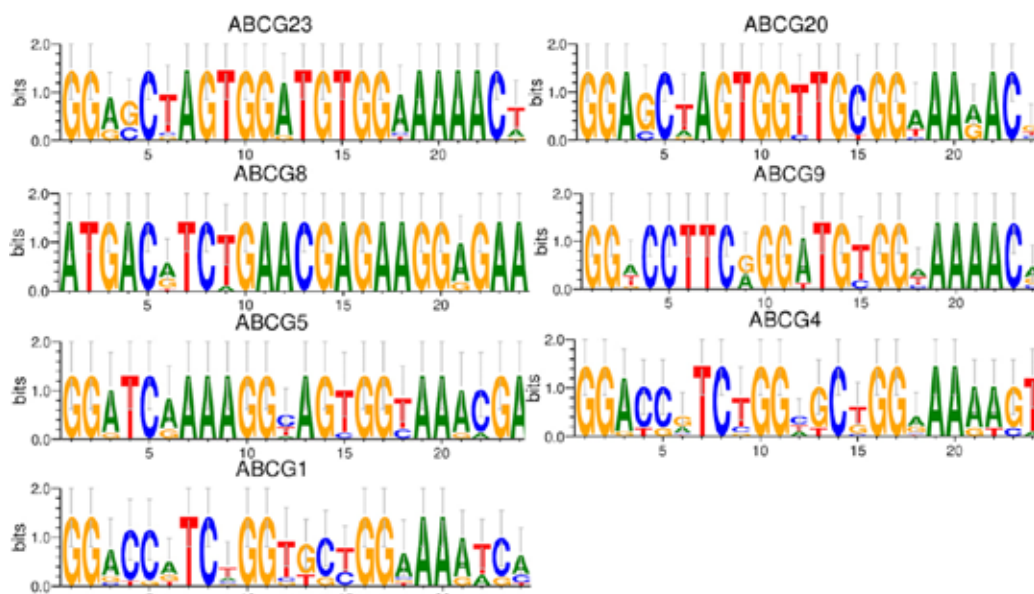


Рис. 2. Нуклеотидные последовательности мотива Walker A у генов подсемейства *ABCG*

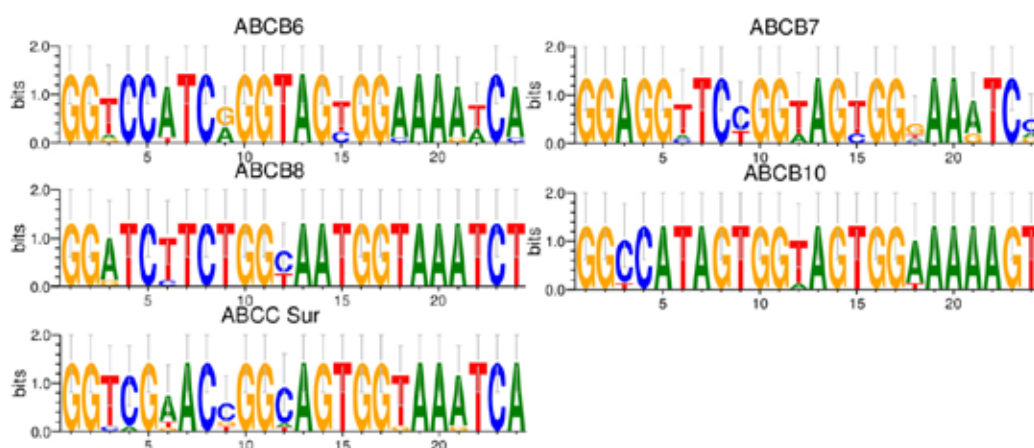


Рис. 3. Нуклеотидные последовательности мотива Walker A у генов подсемейств *ABCB* и *ABCC*

Таблица 1

Количество транс-мембранных спиралей у исследуемых генов *Aphis craccivora*

Подсемейство	ID гена	Ген	Количество ТМ-спиралей	Структура	Длина, АК
<i>ABCA</i>	KAF0773058.1	<i>ABCA1</i>	13	FT	1 635
	KAF0758973.1	<i>ABCA3-like</i>	9	FT	1 566
	KAF0763848.1	<i>ABCA8A-like</i>	12	FT	2 157
<i>ABCB</i>	KAF0744808.1	<i>ABCB6 mitochondrial</i>	6	HT	882
	KAF0769551.1	<i>ABCB7 mitochondrial</i>	4	HT	699
	KAF0761221.1	<i>ABCB8 mitochondrial</i>	6	HT	676
	KAF0752875.1	<i>ABCB10 mitochondrial</i>	6	HT	610

Окончание таблицы 1

Подсемейство	ID гена	Ген	Количество ТМ-спиралей	Структура	Длина, АК
<i>ABCC</i>	KAF0771901.1	<i>ABCC Sur-like (isoform X2)</i>	15	FT	1 655
<i>ABCD</i>	KAF0763033.1	<i>ABCD1</i>	3	HT	207
	KAF0763033.1	<i>ABCD3</i>	5	HT	665
<i>ABCE</i>	KAF0760418.1	<i>ABCE1</i>	–	–	608
<i>ABCF</i>	KAF0767077.1	<i>ABCF4-like 1</i>	–	–	281
	KAF0768358.1	<i>ABCF4-like</i>	–	–	394
	KAF0770661.1	<i>ABCF2-like</i>	–	–	617
	KAF0771974.1	<i>ABCF3</i>	–	–	715
<i>ABCG</i>	KAF0763742.1	<i>ABCG23</i>	6	HT	760
	KAF0753359.1	<i>ABCG9-like isoform X1</i>	6	HT	671
	KAF0769098.1	<i>ABCG4-like</i>	6	HT	693
	KAF0769352.1	<i>ABCG8</i>	7	HT	913
	KAF0762899.1	<i>ABCG1-like</i>	6	HT	612

теров. Члены подсемейства *ABCE* и *ABCF* не имеют транс-мембранных спиралей, что соответствует данным о том, что гены этих белков не функционируют как переносчики, а отвечают за контроль трансляции и ингибируют рибонуклеазы [31]. В таких белках на С- и N-концах присутствуют NBD-домены, что является уникальной структурой, называемой также ABC2 [7]. Семейство *ABCG* является наиболее распространенным у *A. craccivora* и имеет только структуру полутранспортера.

Для имеющихся генов ABC-транспортеров у *A. craccivora* были найдены мотивы, характерные для данного мультигенного семейства (рис. 4). Большая часть найденных мотивов относится к нуклеотид-связывающему домену, некоторые из них специфичны лишь для определенных подсемейств: мотив ABCA (IPR026082) — для подсемейства *ABCA*; ABCG-dom (IPR043926) — для подсемейства *ABCG*, но был обнаружен не у всех генов подсемейства *G*: в последовательностях генов *ABCG20* и *ABCG23* такой мотив не был найден; Type_1_exporter (IPR039421) оказался ха-

рактерным для всех генов подсемейства *ABCB* и *ABCC*, а также для двух генов из *ABCG*-подсемейства — *ABCG20* и *ABCG23*.

Стоит заметить, что повторяемость тех или иных мотивов в последовательности указывает на структуру ABC-транспортертеров. У полутранспортеров (подсемейства *B*, *D*, *G*) лишь однократно встречаются специфичные для гена мотивы, а у полных транспортеров (подсемейства *A*, *C*, *E*, *F*) мотивы закономерно встречаются дважды в одинаковом порядке.

Для оценки сходства генов *ABC* в геноме *A. craccivora* построили филогенетическое дерево с использованием единичных копий гена (рис. 5).

При этом на филогенетическом дереве с высоким значением апостериорной вероятности все последовательности разделились на два больших кластера: в один вошли гены подсемейств *ABCA*, *ABCG* и *ABCC*, а во второй — *ABCF*, *ABCB*, *ABCE* и *ABCD*. Указанное, несомненно, свидетельствует о большей эволюционной близости подсемейств, вошедших в один кластер.

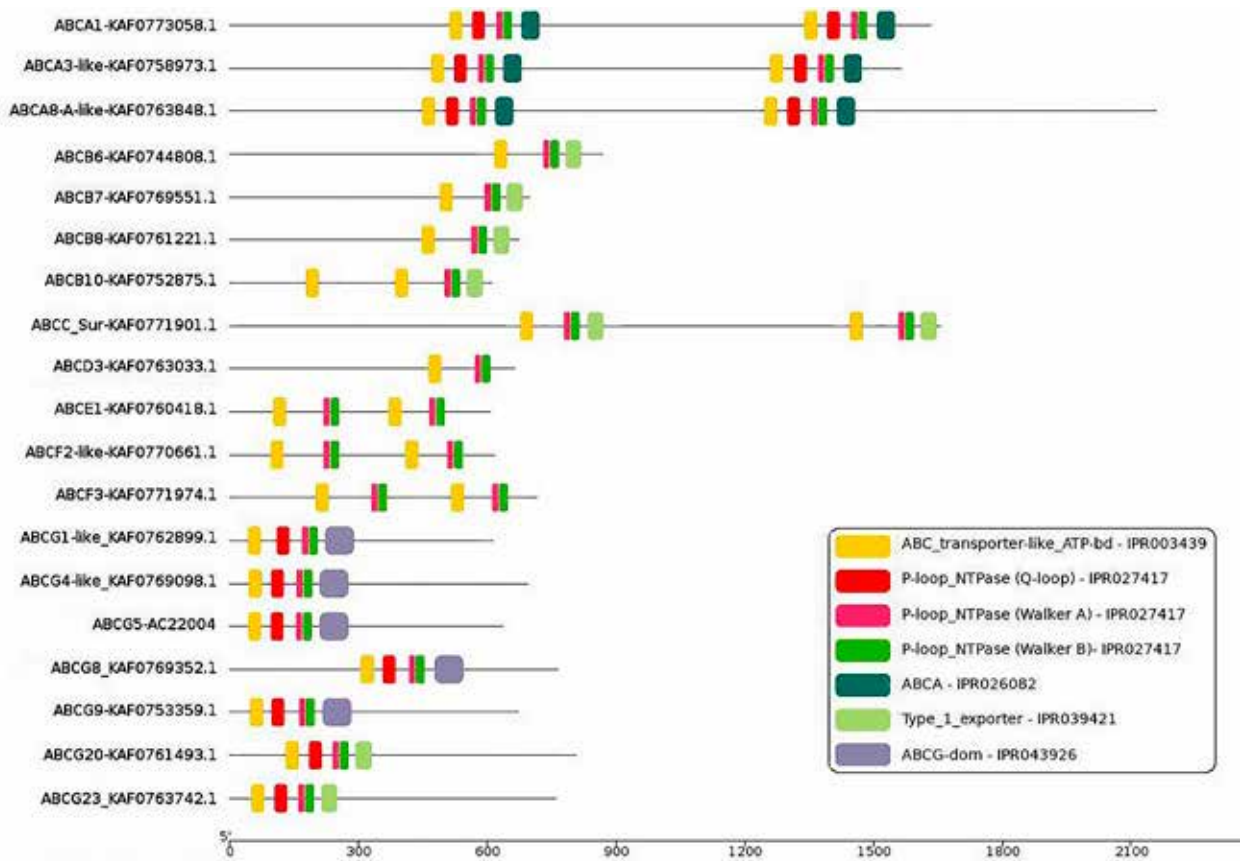


Рис. 4. Мотивы, представленные в ABC-транспортерах *A. craccivora*

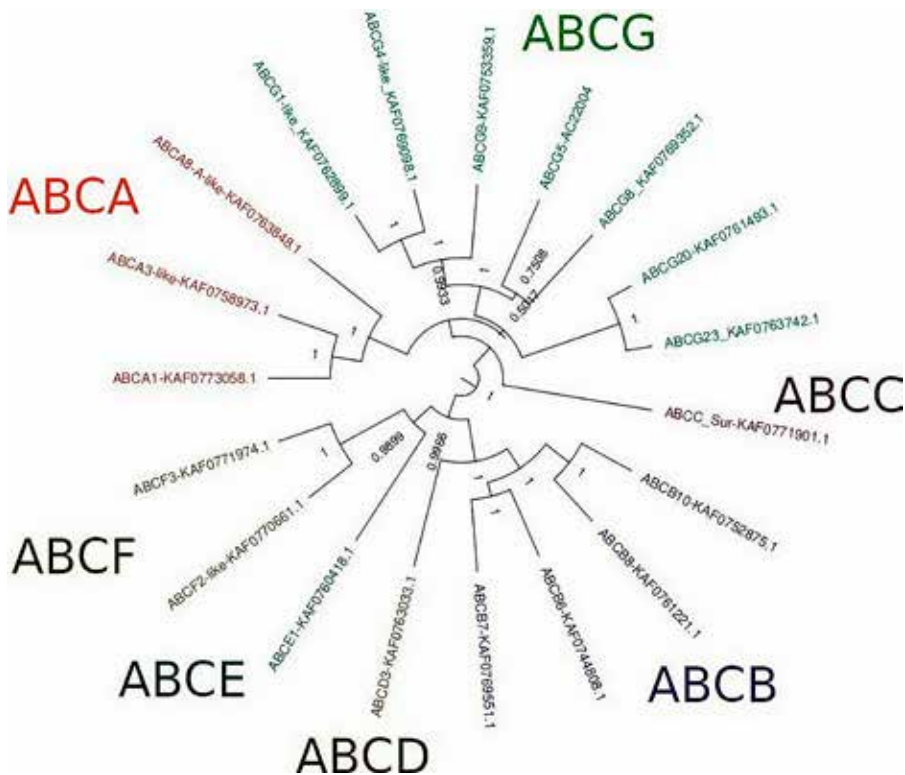


Рис. 5. Филогенетическое дерево генов подсемейств ABC-транспортеров в геноме *A. craccivora*

Заключение

В результате ручной аннотации генов подсемейства ABC-транспортеров впервые у *Aphis craccivora* было обнаружено 52 гена ABC-транспортеров. Среди них наиболее распространенным оказалось подсемейство *ABCG* — 32,9% от всего количества генов. Наиболее высококопийными являются гены *ABCG1*, *ABCG4* и *ABCG23*, их копии обнаружены в количестве от 5 до 22 генов на геном.

В генах ABC-транспортеров наблюдается отклонение ГЦ-состава, часто в сторону его снижения. Для подсемейств *G* и *C* характерно преобладание в кодонах тимина и аденина. В подсемействе *B* процентное содержание аденина в третьей позиции кодонов гена *ABCB10* достигает 41%, а содержание цитозина падает до 7,9%. В последовательностях генов целевых подсемейств наиболее часто отмечаются вариабельные сайты в третьей позиции кодона, которая во всех случаях не приводит к изменению аминокислотного состава белка из-за вырожденности генетического кода, что указывает на низкую общую вариабельность исследуемых генов в геноме *A. craccivora*.

Сравнительный анализ аминокислотных последовательностей функциональных участков генов целевых подсемейств выявил высокую консервативность мотива Walker A. Топология и обнаруженные мотивы во всех подсемействах ABC-транспортеров в геноме *A. craccivora* соответствуют закономерностям структуры полутранспортера (подсемейства *B* и *G*) и полного транспортера (подсемейства *C*).

Филогения ABC-транспортеров выявила два крупных кластера, среди которых в один кластер объединены подсемейства *C* и *G*, что говорит о том, что эти подсемейства генов являются близкородственными по отношению друг к другу, нежели подсемейство *B*. Все остальные гены кластеризуются в соответствии с подсемейством, к которому они относятся.

Список использованных источников

1. AgroAtlas – Pests – *Aphis craccivora* Koch. – Groundnut Aphid [Electronic resource]. – 2023. – Mode of access: http://agroatlas.ru/en/content/pests/Aphis_craccivora/. – Date of access: 14.08.2023.
2. Dermauw, W. The ABC gene family in arthropods: Comparative genomics and role in

insecticide transport and resistance / W. Dermauw, T. Van Leeuwen // *Insect Biochem. Mol. Biol.* – 2014. – Vol. 45. – P. 89–110.

3. Buss, D.S. Interaction of pesticides with p-glycoprotein and other ABC proteins: A survey of the possible importance to insecticide, herbicide and fungicide resistance / D. S. Buss, A. Callaghan // *Pestic. Biochem. Physiol.* – 2008. – Vol. 90, № 3. – P. 141–153.

4. Insect ATP-Binding Cassette (ABC) Transporters: Roles in Xenobiotic Detoxification and Bt Insecticidal Activity / C. Wu [et al.] // *Int. J. Mol. Sci.* – 2019. – Vol. 20, № 11. – P. 2 829.

5. Dean, M. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily / M. Dean, Y. Hamon, G. Chimini // *J. Lipid Res.* – 2001. – Vol. 42, № 7. – P. 1 007–1 017.

6. Structural model of ATP-binding proteing associated with cystic fibrosis, multidrug resistance and bacterial transport / S. C. Hyde [et al.] // *Nature.* – 1990. – Vol. 346, № 6 282. – P. 362–365.

7. Tracing the structural evolution of eukaryotic ATP binding cassette transporter superfamily / J. Xiong [et al.] // *Sci. Rep.* – 2015. – Vol. 5, № 1. – P. 16 724.

8. Overexpression of ATP-binding cassette transporters associated with sulfoxaflor resistance in *Aphis gossypii glover* / L. Wang [et al.] // *Pest Manag. Sci.* – 2021. – Vol. 77, № 9. – P. 4 064–4 072.

9. Multiple ATP-binding cassette transporters genes are involved in thiamethoxam resistance in *Aphis gossypii glover* / Y. Pan [et al.] // *Pestic. Biochem. Physiol.* – 2020. – Vol. 167. – P. 104 558.

10. Functional analysis of cyantraniliprole tolerance ability mediated by ATP-binding cassette transporters in *Aphis gossypii glover* / J. Li [et al.] // *Pestic. Biochem. Physiol.* – 2022. – P. 105 104.

11. Insecticide Resistance Mechanisms in the Green Peach Aphid *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae) I: A Transcriptomic Survey / A. X. Silva [et al.] // *PLoS ONE.* – 2012. – Vol. 7, № 6. – P. e36366.

12. FastQC: The Babraham Bioinformatics group [Electronic resource]. – Mode of access: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/index.html>. – Date of access: 29.05.2023.

13. Trimmomatic: A flexible read trimming tool for Illumina NGS data: RWTH Aachen University [Electronic resource]. – Mode of access: <http://www.usadellab.org/cms/?page=trimmomatic>. –

Date of access: 29.05.2023.

14. Langmead, B. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2 / B. Langmead, S. L. Salzberg // *Nature Methods*. – 2012. – Vol. 9, № 4. – P. 357–359.
15. ABySS 2.0: resource-efficient assembly of large genomes using a Bloom filter / S. D. Jackman [et al.] // *Genome Research*. – 2017. – Vol. 27, № 5. – P. 768–777.
16. Genome Annotation and Curation Using MAKER and MAKER-P / M. S. Campbell [et al.] // *Current Protocols in Bioinformatics*. – 2014. – Vol. 48, № 1. – P. 1–40.
17. Automated eukaryotic gene structure annotation using EVIDENCEModeler and the Program to Assemble Spliced Alignments / B. J. Haas [et al.] // *Genome Biology*. – 2008. – Vol. 9, № 1. – P. 7–39.
18. Apollo: a sequence annotation editor / S. Lewis [et al.] // *Genome Biology*. – 2002. – Vol. 3, № 12. – P. 1–14.
19. Basic local alignment search tool / S. F. Altschul [et al.] // *Journal of Molecular Biology*. – 1990. – Vol. 215, № 3. – P. 403–410.
20. Tamura, K. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11 / K. Tamura, G. Stecher, S. Kumar // *Mol. Biol. Evol.* – 2021. – Vol. 38, № 7. – P. 3 022–3 027.
21. UniProt: the universal protein knowledge-base in 2021 / The UniProt Consortium [et al.] // *Nucleic Acids Research*. – 2021. – Vol. 49, № D1. – P. 480–489.
22. CDD: NCBI's conserved domain database / A. Marchler-Bauer [et al.] // *Nucleic Acids Research*. – 2015. – Vol. 43, № 1. – P. 222–226.
23. Predicting transmembrane protein topology with a hidden markov model: application to complete genomes // Edited by F. Cohen / A. Krogh [et al.] // *J. Mol. Biol.* – 2001. – Vol. 305, № 3. – P. 567–580.
24. The MEME Suite / T. L. Bailey [et al.] // *Nucleic Acids Res.* – 2015. – Vol. 43, № W1. – P. 39–49.
25. Marchler-Bauer, A. CD-Search: protein domain annotations on the fly / A. Marchler-Bauer, S. H. Bryant // *Nucleic Acids Research*. – 2004. – Vol. 32. – P. 327–331.
26. InterProScan: protein domains identifier / E. Quevillon [et al.] // *Nucleic Acids Research*. – 2005. – Vol. 33. – P. 116–120.
27. BEAST 2: A Software Platform for Bayesian Evolutionary Analysis / R. Bouckaert [et al.] // *PLoS Computational Biology* / ed. by Prlic A. – 2014. – Vol. 10, № 4. – P. 1–6.
28. IQ-TREE 2: New Models and Efficient Methods for Phylogenetic Inference in the Genomic Era / B. Q. Minh [et al.] // *Molecular Biology and Evolution* / ed. by Teeling E. – 2020. – Vol. 37, № 5. – P. 1 530–1 534.
29. FigTree [Electronic resource]. – Mode of access: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>. – Date of access: 09.07.2023.
30. Bofkin, L. Variation in Evolutionary Processes at Different Codon Positions / L. Bofkin, N. Goldman // *Mol. Biol. Evol.* – 2006. – Vol. 24, № 2. – P. 513–521.
31. Andersen, D. S. The Essential *Drosophila* ATP-binding Cassette Domain Protein, Pixie, Binds the 40 S Ribosome in an ATP-dependent Manner and Is Required for Translation Initiation / D. S. Andersen, S. J. Leivers // *J. Biol. Chem.* – 2007. – Vol. 282, № 20. – P. 14 752–14 760.

A. A. Lanevich, R. S. Shulinsky, Yu. V. Bondarenko, N. V. Voronova-Barte

CHARACTERISTICS OF ABC TRANSPORTER GENES INVOLVED IN THE PROCESS OF XENOBIOTICS DETOXIFICATION IN THE *APHIS CRACCIVORA* KOCH GENOME, 1854

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

The study determined the variability and structure of the ABC transporter multigene family in the aphid *Aphis craccivora* Koch, 1854, which is a dangerous pest of legumes and nightshade plants actively cultivated in the Republic of Belarus. For the first time, the genome of the aphid under study was sequenced, and the reads were assembled and filtered. ABC transporter genes were predicted and then manually annotated. The gene subfamilies — *ABCB*, *ABCC* and *ABCG*, whose products are involved in the process of insecticide detoxification, were studied.

Keywords: ABC transporters, xenobiotic detoxification, gene variability, aphids.

Дата поступления в редакцию: 27 сентября 2023 г.

В. О. Молчан¹, Е. Г. Скуратович¹, О. Э. Соловей¹, И. С. Юрченко², Д. О. Шатило²,
Г. В. Сергеев³, К. В. Гомель¹, Е. Э. Хейдорова¹, М. Е. Никифоров¹

ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ ПОПУЛЯЦИЙ ЩУКИ ОБЫКНОВЕННОЙ (*ESOX LUCIUS*) И ОКУНЯ РЕЧНОГО (*PERCA FLUVIATILIS*), ОБИТАЮЩИХ В УСЛОВИЯХ РАДИОАКТИВНОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ И НА ИНТАКТНЫХ ТЕРРИТОРИЯХ

¹Государственное научно-производственное объединение
«Научно-практический центр Национальной академии наук Беларуси по биоресурсам»
Республика Беларусь, 220072, г. Минск, ул. Академическая, 27
e-mail: molchan_vladislav@mail.ru

²Государственное природоохранное научно-исследовательское учреждение
«Полесский государственный радиационно-экологический заповедник»
Республика Беларусь, 247618, г. Хойники, ул. Терешковой, 7

³Государственное научное учреждение
«Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси»
Республика Беларусь, 220141, г. Минск, ул. Академика В. Ф. Купревича, 5/2

В статье рассмотрены первые результаты сравнительной оценки генетического разнообразия по митохондриальному маркеру *D-loop* в популяциях щуки обыкновенной (*Esox lucius*) и окуня речного (*Perca fluviatilis*) из водоемов Полесского государственного радиационно-экологического заповедника, находящегося в зоне отчуждения ЧАЭС, и национального парка «Припятский», свободного от загрязнения радионуклидами. Впервые выявлены и описаны различия основных генетических показателей и гаплотипического состава исследованных популяций, в том числе в ряду поколений. Отмечено, что при среднем уровне удельной активности радиоактивного цезия, превышающем 130 Бк/кг, показатели генетического разнообразия заметно выше в возрастных выборках рыб из заповедника, что справедливо для популяций как щуки, так и окуня.

Ключевые слова: хроническое облучение, малые дозы радиации, *Esox lucius*, *Perca fluviatilis*, *D-loop*, мтДНК, гаплотип, ЧАЭС, Полесский государственный радиационно-экологический заповедник.

Введение

Исследования биологических последствий воздействия радионуклидов окружающей среды на диких животных значительно расширились за последние 10 лет [1–5]. С использованием разнообразных цитогенетических и ДНК маркеров установлено, что основной ответ у млекопитающих (лабораторные мыши, дикие мелкие млекопитающие, крупный рогатый скот) на хроническое действие ионизирующего облучения в низких дозах «заключается не в индукции появления новых генов, а в предпочтительном отборе в поколениях новых генных сочетаний» [6]. Является ли это справедливым для свободноживущих популяций других таксономических групп животных, остается неизученным. На сегодняшний день существует объективная необходимость в вы-

полнении сравнительных популяционно-генетических исследований животных разных таксономических групп в зоне отчуждения ЧАЭС и на незагрязненных радионуклидами территориях для оценки влияния хронического облучения малыми дозами радиации на жизнеспособность и адаптационный потенциал дикой фауны в естественной среде.

Рыбы являются подходящими объектами для определения состояния водных экосистем [7–9] и считаются наиболее значимыми биоиндикаторами для оценки уровня загрязнения водоемов металлами [10], т. к. могут их поглощать и аккумулировать непосредственно из окружающей воды через жабры и кожу или косвенно из других организмов растительного и животного происхождения через пищеварительный тракт при приеме загрязненной

пищи [11]. Токсическое действие негативных факторов особенно выражено на ранних стадиях развития рыб [12] и отрицательно влияет на различные метаболические процессы в развивающихся организмах (в частности, на эмбрионы), приводя к задержке развития, морфологическим и функциональным деформациям или смерти наиболее чувствительных особей [11]. В зоне аварии ЧАЭС продолжают регистрироваться высокие уровни содержания радионуклидов в рыбе [12, 13], накопление которых определяется, среди прочего, типом питания, сезонными изменениями в поведении, возрастом и массой особей различных видов рыб [11].

Оценка влияния хронического облучения на популяционное генетическое разнообразие особенно актуальна для редких и находящихся под угрозой исчезновения животных, однако для таких видов чаще всего возникает проблема получения материала в достаточном количестве. Поэтому для зоны аварии ЧАЭС в отношении оценок возможных популяционных изменений подобраны виды-верификаторы, близкие к редким видам по экологическим требованиям [14]. В индикаторную группу как виды-верификаторы облигатных гидробионтов нами включены лещ *Abramis brama*, обыкновенная плотва *Rutilus rutilus* и обыкновенная щука *Esox lucius*, наиболее массовые и широко представленные в зоне отчуждения ЧАЭС и на интактных сопредельных территориях.

Для целей настоящего исследования в качестве объектов выбраны щука, а также дополнительный вид — речной окунь *Perca fluviatilis*, как представитель группы хищных рыб для подтверждения возможных зависимостей геномных ответов в условиях хронического облучения. Оба вида относятся к пелагическим обитателям высокого трофического уровня, являются космополитами и принадлежат к числу рыб, наиболее часто попадающих в уловах, в том числе в Полесском государственном радиационно-экологическом заповеднике (ПГРЭЗ) [15, 16]. Выбор также обусловлен наличием достаточного объема радиобиологической информации по данным видам [17, 18, 19]. Для указанных модельных видов ранее косвенно подтверждено генотоксическое действие среды, которое выражается в изменениях ядерно-цитоплазматического

отношения эритроцитов и частоты встречаемости спонтанных микроядер в эритроцитах [20–23], свидетельствующих о компенсаторных явлениях в системе кровообращения животных, вызванных условиями техногенного загрязнения.

Генетическое разнообразие окуня и щуки изучается достаточно активно [24, 25]. Однако до сих пор не предпринималось попыток изучить генетический статус популяций данных видов, обитающих в водоемах на территории ПГРЭЗ. В данной работе представлены первые результаты сравнительной оценки гаплотипического и нуклеотидного разнообразия на основе анализа участка *D-loop* мтДНК в трех популяциях обыкновенной щуки и четырех популяциях речного окуня, обитающих в относительно изолированных водоемах ПГРЭЗ в условиях радиоактивного загрязнения и на интактных, т. е. с низким уровнем загрязнения радионуклидами, территориях.

Материалы и методы

Образцы биоматериала для настоящего исследования были собраны в 2019–2022 гг. в изолированных водоемах, расположенных на территории с высокой степенью радиоактивной нагрузки в ПГРЭЗ (оз. Гнёздное и Николаевский старик) и на интактной территории национального парка «Припятский» — оз. Плищин и Червоное. Для выявления степени загрязнения водоемов радионуклидами донные отложения отбирались на расстоянии 50–100 см от уреза воды на глубине 30–50 см и высушивались перед проведением измерений в лабораторных условиях при комнатной температуре. Определение удельной активности ^{137}Cs (цезий) и ^{90}Sr (стронций) в биологических пробах проводили гамма-спектрометрическим и радиохимическим методами в аккредитованной лаборатории спектрометрии и радиохимии ПГРЭЗ с использованием гамма-бета спектрометра МКС-АТ1315 и гамма-спектрометра «Canberra». Удельная активность радионуклидов измерялась в беккерелях на килограмм (Бк/кг) сырой массы. Относительная погрешность измерения не превышала 30%. Средние уровни загрязнения выбранных стационаров и исследованных выборок рыб основными дозообразующими

радионуклидами в 2021–2023 гг. представлены в таблице 1. Можно отметить, что уровни удельной активности ^{137}Cs в биоматериале рыб коррелировали с уровнями удельной активности радионуклидов в донных отложениях

и плотностью загрязнения водоемов радиоактивным цезием с существенным возрастанием всех показателей в ряду оз. Плищин/оз. Червоное — оз. Гнёздное — оз. Николаевский старик.

Таблица 1

Средние уровни загрязнения радионуклидами исследовательских стационаров и выборки рыб в 2021–2023 гг.

Стационар	Удельная активность радионуклидов (Бк/кг) в образцах донных отложений		Плотность загрязнения территории (^{137}Cs , кБк/м ²)	Средняя удельная активность ^{137}Cs в выборках образцов, Бк/кг	
	$^{137}\text{Cs} \pm \text{SD}$	$^{90}\text{Sr} \pm \text{SD}$		щуки	окуня
Николаевский старик	7 367 ± 1 480	866 ± 189	1 893,61	188,02	190,40
Гнёздное	2 145 ± 429	341 ± 86	398,57	83,36	169,00
Червоное	49 ± 10	37 ± 14	13,78	–	26,13
Плищин	27 ± 6	42 ± 14	5,44	19,12	22,13

Для целей настоящего исследования использовано 58 образцов биологического материала щук (оз. Гнёздное — 21; оз. Николаевский старик — 20; оз. Плищин — 17) и 60 — окуня (оз. Гнёздное — 15; оз. Николаевский старик — 15; оз. Плищин — 15; оз. Червоное — 15). Изъятие животных проводилось стандартными зоологическими методами по специальным разрешениям в научных целях. Отлов рыб из водоемов зоны отчуждения ЧАЭС проводился сотрудниками ПГРЭЗ; на интактной территории — при содействии рыболовецкой бригады и штатных специалистов национального парка «Припятский».

Определение видов и анализ биологических показателей проводили общепринятыми в ихтиологических исследованиях методами [26, 27]. У добытых рыб устанавливался возраст по числу годовых колец на чешуе [28]. Разновозрастные выборки для сравнительного анализа формировались с учетом продолжительности жизненного цикла рыб: в расчет был принят средний возраст половозрелости для щук и окуней, равный трем годам.

Для генетического анализа отбирались небольшие (до 1 см³) участки мышечной ткани животных и фиксировались в 96%-ом этаноле.

Выделение ДНК проводили с использованием набора компании Jena Bioscience «Animal and Fungi DNA Preparation Kit» согласно протоколу производителя. Качество и количество выделенной ДНК оценивалось на спектрофотометре NanoPhotometer P 330UV/Vis (IMPLEN, Германия). Амплификацию фрагментов митохондриального локуса *D-loop* проводили в стандартной ПЦР-смеси (объемом 25 мкл) с соответствующими праймерами (табл. 2) в термоциклере Biorad C1000 Touch по индивидуальным для каждого вида протоколам (табл. 3).

Качество целевых ПЦР-продуктов проверяли путем электрофоретического разделения в 1,4%-ом агарозном геле в буфере на основе бората натрия с pH = 8,0 в присутствии бромистого этидия. Электрофорез проводили с напряжением 100 V в горизонтальной камере Biorad MiniGel. Целевые фрагменты вырезали из геля и очищали от остатков агарозы с помощью набора NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Macherey Nagel, Германия). Реакции секвенирования проводили с использованием набора BrilliantDye3.1 (Nimagen, Нидерланды). Каждый образец анализировался с помощью прямого и обратного праймеров.

Таблица 2

Характеристики праймеров для амплификации фрагмента митохондриального локуса *D-loop*

Вид рыбы	Наименование праймера	Последовательность праймера (5'–3')	Размер ампликона, ~ п. н.
Щука	CDL-D	TAGCTCCCAAAGCTAAGATTC	501
	PIDL	GCTTGGTGGGTAACGAGTC	
Окунь	HV2	TTCCCCGGTCTTGTA AACCC	521
	CSB-D	GGAACCAAATGCCAGGAA	

Таблица 3

Протоколы амплификации фрагмента митохондриального локуса *D-loop* для исследуемых видов рыб

Для амплификации локуса <i>D-loop</i> щуки			Для амплификации локуса <i>D-loop</i> окуня		
Т, °С	Время	Количество циклов	Т, °С	Время	Количество циклов
95	4 мин	1х	96	5 мин	1х
94	1 мин	39х	96	1 мин	30х
50	55 сек		54	1 мин	
72	1,5 мин		72	2 мин	
72	10 мин	1х	72	6 мин	1х

Сиквенс-продукты очищали методом преципитации в растворе этанол/ЭДТА. Последующее разделение сиквенс-продуктов проводили на генетическом анализаторе ABI3130 (в качестве полимера использовался POP7 polymer) в Институте биоорганической химии НАН Беларуси. Анализ секвенограмм проводили с помощью приложений ContigExpress и AlignX программного комплекса Vector NTI 11. После сопоставления секвенограмм, консенсусную последовательность верифицировали с помощью онлайн ресурса BLAST.

Полученные нуклеотидные последовательности анализировали и выравнивали с использованием алгоритма CrustalW в программе MEGA X [29]. При построении деревьев в качестве внешних групп использовались последовательности амурской щуки *Esox reichertii* (KM281482.1 и KM281483.1) и желтого окуня *Perca flavescens* (OM736839.1 и MH301079.1), депонированные в GenBank NCBI. Анализ внутригруппового генетического разнообра-

зия и распределения гаплотипов проводили в программе DnaSP ver. 6.12.03 [30]. Сеть гаплотипов сконструирована с использованием метода TCS (статистической парсимонии) в PopArt v1.7 (Leigh & Bryant, 2015).

Результаты и их обсуждение

Всего проанализировано 58 и 60 фрагментов мтДНК размером 387 и 344 п. н. у щуки и окуня соответственно, включающих часть контрольного региона (*D-loop*), а также у окуня — небольшой участок гена тРНК в начале анализируемой последовательности.

Щука обыкновенная (Esox lucius)

Среди 58 проанализированных нуклеотидных последовательностей *D-loop* щуки обнаружено девять гаплотипов: по шесть гаплотипов в оз. Николаевский старик и Гнёздное; три гаплотипа — в оз. Плищин. Пять гаплотипов (H2, H3, H4, H5, H6) из всех представленных являются частными, выявленными только в одном из озер в единичном экземпляре.

При этом отмечается повсеместное присутствие гаплотипов H1 и H9 при увеличении доли встречаемости частных гаплотипов в водоемах ПГРЭЗ. Гаплотипический состав в популяциях щуки наглядно представлен на рисунке 1.

В результате сравнительного анализа разновозрастных выборок щук из водоемов ПГРЭЗ (табл. 4) выявлены отличия в гаплотипическом составе их популяций в ряду поколений как для оз. Гнёздное, так и для оз. Николаевский старик. Отмечено, что доминирующий гаплотип H1 (идентичен последовательностям контрольного региона у щук из Швеции и США (MT667236.1, KM281488.1), депонированным в GenBank NCBI) является широко распространенным и, по-видимому, маркирует наиболее устойчивые в широком спектре изменений условий обитания вида генотипы. То же можно сказать и в отношении гаплотипа

H9, т. к. он встречается в оз. Гнёздное во всех исследованных возрастных группах, а в оз. Николаевский старик — у 4–8-летних щук. Если проанализировать данные таблицы 4 в направлении от возрастных особей к более молодым, то можно отметить, что при равнозначных выборках в популяции из одного озера гаплотипический состав разных возрастных групп различается. Вполне вероятно, что немаловажную роль в этом играет действие хронического облучения в среде обитания как в период икротетания, так и на дальнейших постэмбриональных стадиях жизненного цикла рыб. Т. к. в исследовании использовались образцы щук периода, когда выбранные водоемы в течение многих лет не заливались паводковыми водами реки Припять, возможность попадания извне носителей выявленных редких гаплотипов можно считать незначительной.



Рис. 1. Представленность гаплотипов по локусу *D-loop* в различных популяциях щуки

Речной окунь (Perca fluviatilis)

Среди 60 проанализированных нуклеотидных последовательностей *D-loop* окуня обнаружено 10 гаплотипов. Наибольшее количество гаплотипов обнаружено в оз. Плищин и Гнёздное (по пять в каждом). Популяции оз. Червоное и Николаевский старик характеризовались наличием четырех гаплотипов. Семь гаплотипов (Ha1, Ha2, Ha4, Ha5, Ha6, Ha8, Ha10) из всех представленных являются уникальными, не имеющими аналогов на сопредельных территориях по имеющимся на сегодняшний день данным. Анализ участка контрольного региона мтДНК окуня выявил

доминирующую роль гаплотипа Ha1 в популяциях (53,3 и 73,3%) при наличии большого количества редких гаплотипов (рис. 2).

Установлено, что гаплотипы Ha7, Ha3 (C4) и Ha9 (B13) идентичны уже известным последовательностям контрольного региона окуней, депонированным в GenBank NCBI (табл. 5). Гаплотип Ha8 был общим для популяций окуня из оз. Гнёздное и Плищин, гаплотипы Ha3 (C4) и Ha4 — для популяций из оз. Николаевский старик и Червоное, при этом гаплотип Ha3 (C4) ранее был обнаружен на территории Беларуси в Мозыре [31]. Также гаплотип Ha7 был представлен в популяциях окуня из

Таблица 4
Гаплогипический состав популяций щуки в водоемах ПГРЭС (разных возрастных периодов) и в интактном водоеме

Водоем	Гаплогип	Количество образцов	Представленность гаплогипов в разных возрастных выборках образцов щуки			Аналог в NCBI	
			до 3 лет	4–8 лет	9–12 лет		
озеро Пездное	H1	14	MRpi01682, MRpi01681, MRpi01529, MRpi01528	MRpi01827, MRpi01822, MRpi01482, MRpi01310, MRpi01548, MRpi01680, MRpi01678, MRpi01527, MRpi01369, MRpi01445	нет данных	MT667236.1, KM281488.1	
	H3	1	не выявлен	MRpi01677		–	
	H4	1	MRpi01377	не выявлен		–	
	H7	1	MRpi01702	не выявлен		–	
	H8	1	MRpi01562	не выявлен		–	
	H9	3	MRpi01311	MRpi01679, MRpi01786		–	
	H1	14	MRpi01292, MRpi01635, MRpi01608, MRpi01578, MRpi01574	MRpi01606, MRpi01568, MRpi01419, MRpi01394		MRpi01848, MRpi01775, MRpi01774, MRpi01599, MRpi01598	MT667236.1, KM281488.1
	H2	1	MRpi01573	не выявлен		не выявлен	–
	H6	1	не выявлен	не выявлен		MRpi01634	–
H7	2	не выявлен	MRpi01905, MRpi01418	не выявлен	–		
H8	1	не выявлен	не выявлен	MRpi01773	–		
H9	1	не выявлен	MRpi01569	не выявлен	–		
озеро Плищин	H1	15	PI02226, PI02227, PI02225, PI02224, PI02223, PI02222, PI02221, PI02219, PI02218, PI02131, PI02130, PI02129, PI02128, PI02127, PI02228			MT667236.1, KM281488.1	
	H5	1		PI02220		–	
	H9	1		PI02229		–	



Рис. 2. Представленность гаплотипов D-loop в различных популяциях окуня

оз. Червоное, Гнездное и Николаевский старик и является идентичным известным последовательностям из Дании (MT410943.1) и Франции (SM020933.1). В популяции окуня оз. Плицин был обнаружен гаплотип Ha9 (B13), идентичный последовательности MN028038.1 из оз. Цириш в Латвии. Остальные гаплотипы являются уникальными, причем гаплотипы Ha2 и Ha5 встречались только в популяции из оз. Гнездное, гаплотип Ha6 и Ha10 — только в оз. Плицин.

В популяциях окуня, так же как и щуки, отмечаются отличия в гаплотипическом составе в ряду поколений в водоемах ПГРЭЗ (табл. 5). Уверенно можно констатировать, что только гаплотип Ha1 сохраняет свое присутствие во всех возрастных группах окуней в каждом из водоемов. В основном же возрастные группы окуней отличаются набором характеризующих их редких гаплотипов.

Разнообразие и связь выявленных гаплотипов щуки и окуня иллюстрируют парсимониальные сети на рисунке 3.

В парсимониальной сети гаплотипов щуки обращает на себя внимание гаплотип H8, который обнаружен только в водоемах ПГРЭЗ и отстоит на три (в отличие от большинства других гаплотипов) замены от доминирующего гаплотипа H1. В целом структура полученных гаплотипических сетей, построенных по фрагменту контрольного региона щуки и окуня, свидетельствует о возможности постепенного образования редких гаплотипов из центрального (доминирующего), характер-

ного для исследованного вида рыб. Степень выраженности отличий в гаплотипическом составе популяций рыб из водоемов ПГРЭЗ и НП «Припятский» отражается также в показателях их генетического разнообразия, которые представлены в таблице 6.

Из данных таблицы 6 следует, что средние показатели гаплотипического и нуклеотидного разнообразия в популяциях щуки из ПГРЭЗ превышают аналогичные значения в популяции на интактной территории в 2,3–2,4 раза. На примере окуня таких различий не наблюдалось, и упомянутые популяционные показатели в водоемах ПГРЭЗ находятся в пределах значений, установленных для интактной зоны. Однако если проанализировать данные таблицы через призму возрастных особенностей, то можно отметить, что при среднем уровне удельной активности радиоактивного цезия >130 Бк/кг (выше допустимого предела Гигиенического норматива «Критерии оценки радиационного воздействия», утвержденного постановлением Совета Министров Республики Беларусь от 29 ноября 2022 г. № 829 по содержанию ^{137}Cs в рыбе (130 Бк/кг), а также Приложения 4 Технического регламента Таможенного союза «О безопасности пищевой продукции» от 9 декабря 2011 г. № 880), показатели гаплотипического и нуклеотидного разнообразия и среднее число нуклеотидных различий заметно (в 2–3 раза) выше в возрастных выборках (>4 лет) по сравнению с молодыми особями (<4 лет), что справедливо для популяций как щуки, так и окуня.

Таблица 5
Гаплогенетический состав популяций окуня в водоемах ПГРЭС (разных возрастных периодов) и в интактных водоемах

Водоем	Гаплогипн	Количество образцов	Представленность гаплогипнов в разных возрастных выборках образцов окуня		Аналог в NCBI
			до 3 лет	4–6 лет	
озеро Тнездное	Ha1	8	MRpi01536, MRpi01533, MRpi01515	MRpi01737, MRpi01728, MRpi01514, MRpi00507, MRpi01447	–
	Ha2	1	не выявлен	MRpi01687	–
	Ha5	3	MRpi01538	MRpi01472, MRpi01462	–
	Ha7	2	не выявлен	MRpi01734, MRpi01451	MT410943.1; CM020933.1
	Ha8	1	не выявлен	MRpi00508	–
	Ha1	11	MRpi01915, MRpi01884, MRpi01652, MRpi01409, MRpi00547, MRpi00439	MRpi01811 MRpi01759 MRpi01645 MRpi01432, MRpi00433	–
	Ha3 (C4)	1	MRpi01407	не выявлен	MH028040.1
	Ha4	2	не выявлен	MRpi01894, MRpi00546	–
озеро Червоное	Ha7	1	не выявлен	MRpi00545	MT410943.1; CM020933.1
	Ha1	8	PI02202, PI02200, PI02199, PI02198, PI02194, PI02088, PI02082, PI02070		–
	Ha3 (C4)	4	PI02205, PI02197, PI02196, PI02084		MH028040.1
	Ha4	2	PI02195, PI02203		–
	Ha7	1	PI02085		MT410943.1; CM020933.1
озеро Плищин	Ha1	11	PI02210, PI02208, PI02171, PI02170, PI02168, PI02164, PI02166, PI02161, PI02159, PI02158, PI02162		–
	Ha6	1	PI02165		–
	Ha8	1	PI02172		–
	Ha9 (B13)	1	PI02209		MH028038.1
	Ha10	1	PI02167		–

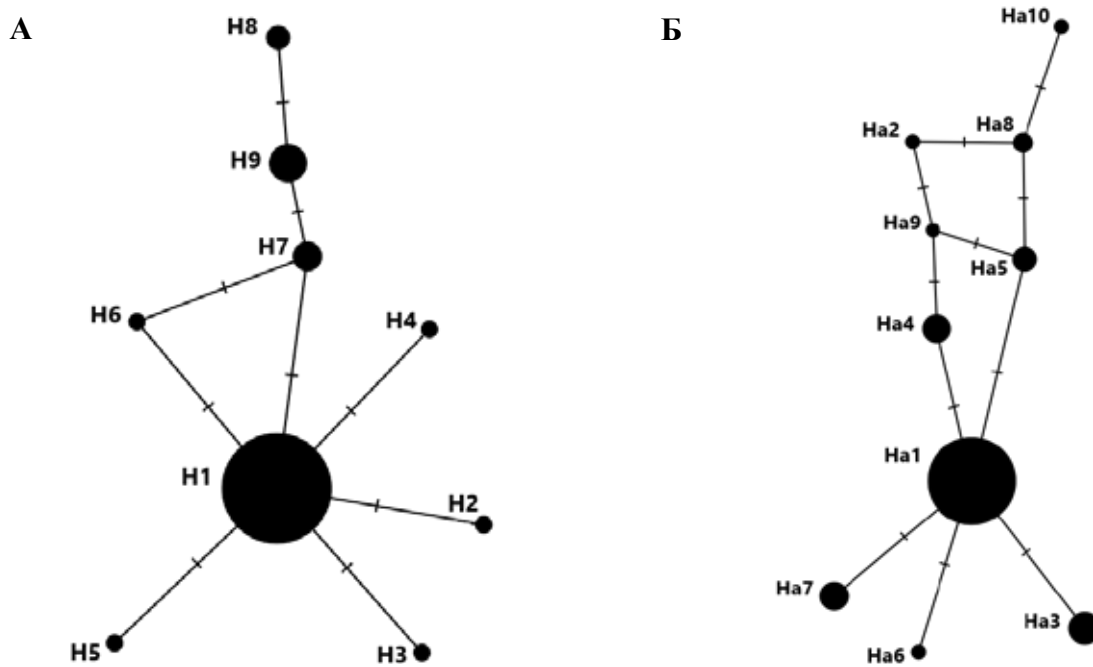


Рис. 3. Парсимониальная сеть гаплотипов по локусу *D-loop*: А — щука, Б — окунь.
 Н/На — обозначение гаплотипа

Таблица 6

Показатели генетического разнообразия по локусу *D-loop* в популяциях щуки и окуня, обитающих в условиях загрязнения радионуклидами и на интактных территориях

Озеро	Группы	N	H	V	Eta	Hd (±SD)	π	k	¹³⁷ Cs, Бк/кг
Щука (<i>Esox lucius</i>)									
Гнёздное	total	21	6	5	5	0,552 ± 0,122	0,00258	0,990	<130,00
	0–3 лет	8	5	4	4	0,786 ± 0,151	0,00380	1,464	
	4–8 лет	13	3	3	3	0,410 ± 0,154	0,00187	0,718	
Николаевский старик	total	20	6	4	5	0,516 ± 0,132	0,00210	0,805	>130,00
	0–3 лет	7	2	1	1	0,286 ± 0,196	0,00074	0,286	
	4–8 лет	6	3	2	2	0,733 ± 0,155	0,00243	0,933	
	9–12 лет	7	3	3	4	0,524 ± 0,209	0,00284	1,095	
Плищин	total	17	3	3	3	0,228 ± 0,129	0,00092	0,353	<ПУ
Окунь (<i>Perca fluviatilis</i>)									
Гнёздное	total	15	5	4	4	0,629 ± 0,125	0,00286	0,990	>130,00
	0–3 лет	4	2	1	1	0,500 ± 0,265	0,00145	0,500	
	4–6 лет	11	5	4	4	0,782 ± 0,107	0,00389	1,345	
Николаевский старик	total	15	4	3	3	0,467 ± 0,148	0,00149	0,514	>130,00
	0–3 лет	7	2	1	1	0,286 ± 0,196	0,00083	0,286	
	4–6 лет	8	3	2	2	0,607 ± 0,164	0,00196	0,679	

Окончание таблицы 6

Озеро	Группы	N	H	V	Eta	Hd (\pm SD)	π	k	^{137}Cs , Бк/кг
Червоное	total	15	4	3	3	0,667 \pm 0,099	0,00232	0,800	<РУ
Плищин	total	15	5	5	5	0,476 \pm 0,155	0,00258	0,876	<РУ

Примечание. total – общая выборка; N — объем выборки, количество последовательностей; H — число гаплотипов; V — число варибельных сайтов; Eta — количество мутаций; Hd — гаплотипическое разнообразие с учетом стандартного отклонения (SD); π — нуклеотидное разнообразие; k — среднее число нуклеотидных различий; ^{137}Cs — средняя удельная активность радиоактивного цезия в образцах исследованных выборок; РУ — референтный уровень

При этом нуклеотидное разнообразие и среднее число нуклеотидных различий в группе моложе 3–4 лет оказались ниже средних показателей, установленных для популяций обоих видов из интактных водоемов. Значения гаплотипического разнообразия у молодой части популяций равны или ниже аналогичного показателя в интактных популяциях. Обращают на себя внимание наиболее выраженные отличия между возрастными группами в оз. Николаевский старик (в 1,6–3,1 раза ниже установленных для интактных водоемов). С учетом того, что оз. Николаевский старик отличается наиболее высокими уровнями загрязнения радионуклидами донных отложений и удельной активности радиоактивного цезия в биоматериале исследованных рыб, выявленные генетические различия могут оказаться не случайными, однако это требует подтверждения на более репрезентативном материале. При этом стоит учитывать, что в загрязненных радионуклидами озерах структура ихтиокомплексов не испытывает такого антропогенного воздействия, которое характерно для эксплуатируемых водоемов, что также может являться одним из значимых факторов выявленных изменений в гаплотипическом составе.

Заключение

Результаты проведенного по маркеру *D-loop* мтДНК сравнительного анализа полиморфизма популяций щуки обыкновенной и окуня речного, обитающих в условиях радиоактивного загрязнения и на интактных территориях, позволили впервые выявить и описать различия их основных генетических показателей и гаплотипического состава, в том числе в ряду поколений. При сохранении

доминирования наиболее распространенных гаплотипов выявлены уникальные гаплотипы, различающие озерные популяции каждого вида рыб как между собой, так и между внутрипопуляционными возрастными группами. Отмечено, что при среднем уровне удельной активности радиоактивного цезия, превышающем 130 Бк/кг, показатели генетического разнообразия заметно выше в возрастных выборках рыб из ПГРЭЗ, что справедливо для популяций как щуки, так и окуня. При этом нуклеотидное разнообразие и среднее число нуклеотидных различий у молодых особей из загрязненных радионуклидами водоемов оказались ниже средних показателей, установленных для популяций обоих видов из интактных зон, при, соответственно, равных (или чуть ниже) показателях гаплотипического разнообразия. Для более полной характеристики особенностей генетической структуры исследованных видов рыб в загрязненных радионуклидами водоемах необходимо сопоставить полученные данные с результатами по другим областям генома, в частности ядерной ДНК.

Список использованных источников

1. Beresford, N. A. Effects of ionizing radiation on wildlife: What knowledge have we gained between the Chernobyl and Fukushima accidents? / N. A. Beresford, D. Copplestone // Integrated Environmental Assessment and Management. – 2011. – Vol. 7. – P. 371–373.
2. Beresford, N. A. Thirty years after the Chernobyl accident: What lessons have we learnt? / N. A. Beresford [et al.] // Journal of Environmental Radioactivity. – 2016. – Vol. 157. – P. 77–89.
3. Addressing ecological effects of radiation on populations and ecosystems to improve

- protection of the environment against radiation: Agreed statements from a Consensus Symposium / F. Bréchnac [et al.] // *Journal of Environmental Radioactivity*. – 2016. – Vol. 158–159. – P. 21–29.
4. Ecological mechanisms can modify radiation effects in a key forest mammal of Chernobyl / T. Mappes [et al.] // *Ecosphere*. – 2019. – Vol. 10. – P. 1–11.
5. Genetic and ecological studies of animals in Chernobyl and Fukushima / T. A. Mousseau [et al.] // *Journal of Heredity*. – 2014. – Vol. 105. – P. 704–709.
6. Глазко, В. И. Действие ионизирующей радиации на популяционно-генетические параметры млекопитающих / В. И. Глазко, Т. Т. Глазко // *Известия ТСХА*. – 2008. – Вып. 1. – С. 178–188.
7. Marshall Adams, S. A comparison of health assessment approaches for evaluating the effects of contaminant-related stress on fish populations / S. Marshall Adams, M. G. Ryon // *Journal of Aquatic Ecosystem Health*. – 1994. – Vol. 3, № 1. – P. 15–25.
8. Whitfield, A. K. Fishes as indicators of environmental and ecological changes within estuaries: a review of progress and some suggestions for the future / A. K. Whitfield, M. Elliott // *Journal of Fish Biology*. – 2002. – Vol. 61. – P. 229–250.
9. Authman, M. M. N. Assessment of metal status in drainage canal water and their bioaccumulation in *Oreochromis niloticus* fish in relation to human health / M. M. N. Authman, H. H. Abbas, W. T. Abbas // *Environmental Monitoring and Assessment*. – 2013. – Vol. 185, № 1. – P. 891–907.
10. Rashed, M. N. Monitoring of environmental heavy metals in fish from Nasser Lake / M. N. Rashed // *Environment International*. – 2001. – Vol. 27, № 1. – P. 27–33.
11. Sfakianakis, D. G. Effect of heavy metals on fish larvae deformities: A review / D. G. Sfakianakis [et al.] // *Environmental Research*. – 2015. – Vol. 137. – P. 246–255.
12. Vinodhini R. Bioaccumulation of heavy metals in organs of fresh water fish *Cyprinus carpio* (Common carp) / R. Vinodhini, M. Narayanan // *International Journal of Environmental Science & Technology*. – 2008. – Vol. 5, № 2. – P. 179–182.
13. Fazio, F. Bioaccumulation of heavy metals in blood and tissue of striped mullet in two Italian lakes / F. Fazio [et al.] // *Journal of Aquatic Animal Health*. – 2014. – Vol. 26, № 4. – P. 278–284.
14. Генетический мониторинг популяций диких животных в условиях радиационного загрязнения: концепция и пути ее реализации / Е. Э. Хейдорова [и др.] // *Современные проблемы радиобиологии — 2021: материалы международной научной конференции (23–24 сентября 2021 г., Гомель)* / Государственное научное учреждение «Институт радиобиологии Национальной академии наук Беларуси». – Минск: ИВЦ Минфина, 2021. – С. 182–186.
15. Жуков, П. И. Рыбы Белоруссии / П. И. Жуков. – Минск, 1965. – 298 с.
16. Жуков, П. И. Справочник по экологии пресноводных рыб / П. И. Жуков. – Мн.: Наука и техника, 1988. – 310 с.
17. Иванцов, Д. Н. Накопление и распределение по органам и тканям долгоживущих радионуклидов ^{137}Cs и ^{90}Sr в организме пресноводных рыб, обитающих в водоемах Полесского государственного радиационно-экологического заповедника / Д. Н. Иванцов, А. В. Гулаков // *Известия Гомельского гос. ун-та им. Ф. Скорины. Естественные науки*. – 2018. – № 6 (111). – С. 29–35.
18. Иванцов, Д. Н. Накопление ^{137}Cs представителями ихтиофауны водоемов, расположенных на территории Полесского радиационно-экологического заповедника / Д. Н. Иванцов // *Творчество молодых, 2019: сб. науч. работ студентов, магистрантов и аспирантов / ГГУ им. Ф. Скорины; редкол.: Р. В. Бородич [и др.]*. – Гомель, 2019. – С. 53–55.
19. Murphy, J. F. Abundance and diversity of aquatic macroinvertebrate communities in lakes exposed to Chernobyl-derived ionising radiation / J. F. Murphy, L. L. Nagorskaya, J. T. Smith // *Journal of Environmental Radioactivity*. – 2011. – Vol. 102, № 7. – P. 688–694.
20. Кузина, Т. В. Цитофизиологические особенности крови промысловых рыб Волго-каспийского канала: автореф. дисс. канд. биол. наук: 07.00.02 / Т. В. Кузина. – Астрахань, 2011. – 26 с.
21. Лугаськова, Н. В. Адаптивные особенности системы крови окуня и линя в условиях загрязнения и эвтрофикации водоемов / Н. В. Лугаськова, Р. А. Найсыров // *Сибирский экологический журнал*. – 2001. – Т. 8, № 6. – С. 735–739.

22. Ильинских, Н. Н. Микроядерный анализ и цитогенетическая нестабильность / Н. Н. Ильинских, В. В. Новицкий, Н. Н. Ванчугова. – Томск: Изд-во Томского университета, 1992. – 272 с.
23. Ильин, Д. А. Аспекты формирования микроядер (обзор литературы) / Д. А. Ильин // Естественное и гуманитарное: сб. науч. работ. – Томск, 2005. – Т. 3, № 4. – С. 20–22.
24. Genetic evidence for different migration routes of freshwater fish into Norway revealed by analysis of current perch (*Perca fluviatilis*) populations in Scandinavia / U. H. Refseth [et al.] // *Molecular Ecology*. – 1998. – Vol. 7, № 8. – P. 1 015–1 027.
25. Генетическое разнообразие популяций щуки обыкновенной *Esox lucius* L. из рек северо-востока России / Л. Т. Бачевская [и др.] // *Изв. РАН. Сер. биол.* – 2019. – Т. 2 019, № 2. – С. 154–161.
26. Методика комплексной оценки состояния сообществ и популяций доминирующих млекопитающих, амфибий и рыб / С. Н. Гашев [и др.]. – Тюмень: ТюмГУ, 2005. – 94 с.
27. Брюзгин, В. Л. Методы изучения рыб по чешуе, костям и отолитам / В. Л. Брюзгин. – Киев: Наук. Думка., 1969. – 187 с.
28. Чугунова, Н. И. Руководство по изучению возраста и роста рыб: метод. пособие по ихтиологии / Н. И. Чугунова. – М.: Изд-во АН СССР, 1959. – 165 с.
29. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms / S. Kumar [et al.] // *Molecular Biology and Evolution*. – 2018. – Vol. 35. – P. 1 547–1 549.
30. DnaSP 6: DNA Sequence Polymorphism Analysis of Large Data Sets / J. Rozas [et al.] // *Molecular Biology and Evolution* – 2017. – Vol. 34. – P. 3 299–3 302.
31. Complex phylogeographic relationships among the Eurasian perch (*Perca fluviatilis*) populations in the eastern part of the Baltic Sea Region / A. Ragauskas [et al.] // *Hydrobiologia*. – 2020. – Vol. 847, № 3. – P. 925–938.

V. O. Molchan¹, E. G. Skuratovich¹, O. E. Solovei¹, I. S. Yurchenko², D. O. Shatilo², G. V. Sergeev³,
K. V. Homel¹, E. E. Kheidorova¹, M. E. Nikiforov¹

GENETIC DIVERSITY OF NORTHERN PIKE (*ESOX LUCIUS*) AND EUROPEAN PERCH (*PERCA FLUVIATILIS*) POPULATIONS LIVING UNDER THE CONDITIONS OF RADIOACTIVE CONTAMINATION AND IN INTACT TERRITORIES

¹State Scientific and Production Association

“Scientific and Practical Center of the National Academy of Sciences of Belarus for Bioresources”

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

e-mail: molchan_vladislav@mail.ru

²State Environmental Research Institution

“Polesie State Radiation-Ecological Reserve”

7 Tereshkova St., 247618 Khoyniki, the Republic of Belarus

³State Scientific Institution

“Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus”

5/2 Academician Kuprevich St., 220141 Minsk, the Republic of Belarus

The article discusses the first results of a comparative assessment of genetic diversity by the mitochondrial D-loop marker in the northern pike (*Esox lucius*) and European perch (*Perca fluviatilis*) populations from the reservoirs of the Polesie State Radiation-Ecological Reserve located in the Chernobyl Nuclear Power Plant exclusion zone, and the Prip'yatsky National Park free from radionuclide contamination. For the first time, differences in the main genetic indicators and the haplotype composition of the studied populations, including a number of generations, were identified and described. It was noted that with an average level of the specific activity of radiocesium exceeding 130 Bq/kg, genetic diversity indicators are noticeably higher in the age samplings of fish from the Reserve, which is true both for pike and perch populations.

Keywords: chronic exposure, low radiation doses, *Esox lucius*, *Perca fluviatilis*, D-loop, mtDNA, haplotype, the Chernobyl Nuclear Power Plant, the Polesie State Radiation-Ecological Reserve.

Дата поступления в редакцию: 07 февраля 2024 г.

В. Н. Кипень, Е. В. Снытков, М. Е. Михайлова, Р. И. Шейко

ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ ПОРОД СВИНЕЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ТЕХНОЛОГИИ KASP — ТЕСТ-СИСТЕМА ДЛЯ ПОРОДЫ ДЮРОК

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

На биологическом материале (ушные выщипы свиней пород белорусская крупная белая, белорусская мясная, дюрок, ландрас, йоркшир) установлен высокий дифференцирующий потенциал полиморфных вариантов rs80967182, rs81333725 (*RXFP1*) и rs80859281 (*ASAH2*) для дифференциации свиней породы дюрок. Предложена тест-модель из трех однонуклеотидных полиморфизмов для идентификации свиней породы дюрок, которая отличается высокими значениями точности (98,4%), специфичности и чувствительности. С использованием KASP разработан быстрый и простой подход к дифференциации на основании предложенной тест-модели, который призван сократить временные и финансовые затраты на молекулярно-генетический анализ, а также снизить риск кросс-контаминации, т. к. процесс является одностадийным (исключены этапы рестрикции и электрофореза).

Ключевые слова: *Sus scrofa domesticus*, однонуклеотидный полиморфизм, дифференциация, конкурентная аллель-специфическая ПЦР (KASP, Kompetitive allele specific PCR), генотипирование *in silico*.

Введение

В свиноводстве и птицеводстве производственными животными обычно являются трех- или четырехпородные помеси. Скрещивание приводит к получению экономических выгод, в основе которых находятся гетерозис и комплементарность пород. Для улучшения продуктивности животных в каждой из чистопородных родительских линий проводится селекция. До эры геномики этот отбор часто основывался на чистопородных характеристиках, поскольку проследить родословную гибридных производственных животных до их чистопородных предков оказывалось проблематично или невозможно [1]. В данный момент подтверждение чистопородности с использованием молекулярно-генетических методов возможно на любой стадии селекционного процесса. Определение чистопородности сельскохозяйственных животных играет ключевую роль в селекционном процессе, в частности для свиноводства и для животноводства в целом.

Развитие методологически-материальной базы молекулярно-генетических методов и снижение финансовых и временных затрат

подобных исследований обусловили полный переход породных ассоциаций ряда стран (США, Канада, Германия и др.) на использование ДНК-анализа, что значительно увеличивает точность селекционного процесса. Кроме того, созданные параллельно ДНК-банки являются основой проведения генетического мониторинга пород и популяций, а также исследований по идентификации и внедрению технологий маркерной селекции [2].

Определение чистопородности сельскохозяйственных животных в селекционном процессе имеет ключевое значение для всей отрасли животноводства. По причине того, что количественные признаки в подавляющем большинстве случаев наследуются полигенно, т. е. предетерминированы совокупностью генов и их функциональным состоянием, определение значимых корреляций между SNP (Single nucleotide polymorphisms) и фенотипическим признаком на высоком уровне статистической значимости осуществимо только при полногеномных поисках ассоциаций — GWAS (Genome-Wide Association Studies).

Выявленные генетические ассоциации на уровне генома необходимо в обязательном по-

рядке проверять и подтверждать в дальнейших субпопуляционных исследованиях. В первую очередь результаты GWAS способствуют тому, чтобы обозначить исследователю область поиска в геноме для выявления локусов (генов), ответственных за наследование того или иного признака. В этой связи приоритетной задачей для исследователей биоинформатического профиля становится определение SNP, расположенных вблизи генетических маркеров, дифференцирующий потенциал которых был определен ранее.

Для Республики Беларусь свиноводство является традиционной отраслью сельского хозяйства, а в перечень разводимых пород входят такие, как белорусская крупная белая, белорусская черно-пестрая, эстонская беконная, ландрас, дюрок и др. Доминирующей породой в этом перечне является белорусская крупная белая, однако и остальные породы составляют значительную часть генофонда свиней Республики Беларусь.

Определение чистопородности свиней может быть проведено с использованием SNP или STR (Short tandem repeat) маркеров. Одними из главных преимуществ использования STR-локусов является возможность их мультиплексирования (10–15 локусов в одной пробирке), а также относительно низкая стоимость анализа при массовом генотипировании. Также для характеристики определенного фенотипического признака необходимо, чтобы ген, ответственный за этот признак, находился в одной группе сцепления с STR-локусом. Как правило, STR-локусы в данном контексте менее информативны, чем SNP. Технология мультиплексирования SNP сегодня достигла уровня, который позволяет за один запуск прибора (ридер чипов или секвенатор для массового параллельного секвенирования) охарактеризовать десятки и сотни тысяч SNP одновременно для сотен животных. Так, компанией Illumina® разработан чип для полногеномного анализа SNP для животных вида *Sus scrofa* — PorcineSNP60 BeadChip [3], включающий в себя более 60 тыс. полиморфных вариантов.

Ramos A. M. с соавторами применяли данную технологию для оценки дифференцирующего потенциала ряда SNP для определения чистопородности свиней пород дюрок, ланд-

рас, крупная белая и пьетрен [4]. За последние 10 лет в научных журналах было опубликовано более 50 работ, которые посвящены поиску видо- и породоспецифичных SNP для вида *S. scrofa*. В основном исследователи прибегали к использованию чиповых технологий производства Illumina®. Также SNP были исследованы в ряде работ для оценки QTL или чистопородности для пород свиней крупная белая [2, 4–12], ландрас [4, 6, 11–14], дюрок [4, 11–13, 15], пьетрен [4, 11–13, 16]. Оценка генетического разнообразия пород свиней в контексте решения ряда задач по криминалистике обсуждалась в исследованиях Roberts K. S. с соавторами [17], Stratz P. с соавторами [16], Wilkinson S. с соавторами [11], Кипень В. Н. с соавторами [18] и др.

Как правило, исследователи, применявшие PorcineSNP60 BeadChip, либо не приводят информацию о дифференцирующем потенциале конкретного SNP в контексте различения пород свиней, либо предпочитают кодировать их спектр. Однако в настоящее время имеется довольно много информации, находящейся в открытом доступе в Национальном центре биотехнологической информации (NCBI, National Center for Biotechnology Information), относительно полногеномных секвенсных проектов для вида *S. scrofa*. По состоянию на 2023 г. в открытом доступе зарегистрирована информация о более чем 300 полностью секвенированных геномах свиней пород дюрок, ландрас, крупная белая, пьетрен и др., характеризующихся достаточной глубиной прочтения для определения генотипа *in silico* с использованием методов биоинформатики.

Свиньи породы дюрок были впервые выведены в Северной Америке в 1860-х гг. и распространились по всему миру как одна из самых известных тощих пород свиней [19]. Свиньи данной породы характеризуются быстрым темпом роста, высокой устойчивостью к неблагоприятным воздействиям и хорошими характеристиками туши. Дюрок является одной из самых популярных коммерческих пород во всем мире. Интенсивный искусственный отбор в породе привел к значительным генетическим улучшениям по множеству представляющих экономический интерес признаков. Свиньи дюрок стали основой для многих коммерческих тощих хряков смешанных

пород благодаря их превосходным характеристикам с точки зрения роста, эффективности усвояемости корма, телосложения, туши и качества мяса [20]. Например, коммерческие свиньи породы Дюрок × (Ландрас × Йоркшир) доминируют на рынке свинины в Китайской Народной Республике. В Республике Беларусь дюрок используется в селекционных схемах и является высоко значимой породой для улучшения характеристик гибридных линий, поэтому отбор для селекционных мероприятий «чистых» особей, без примеси других пород, является актуальной задачей, которую возможно решить с использованием комбинированного подхода, используя методологию биоинформатики и молекулярной биологии.

Исходя из вышеизложенного, цель данной работы — выявить и исследовать SNP с высоким дифференцирующим потенциалом для различения свиней породы дюрок с другими породами, представленными в Беларуси. Для достижения поставленной цели был решен ряд задач: с использованием методов биоинформатики проведено генотипирование *in silico* для коммерческих пород свиней, геномы которых представлены в NCBI; с использованием методов статистики отобраны наиболее информативные SNP; с использованием технологии KASP определен генотип для отобранных SNP и предложена тест-модель для дифференциации.

Материалы и методы

Биологические образцы

В исследование было включено 328 образцов биологического материала (ушной выщип) вида *S. scrofa domesticus* следующих пород: дюрок (ДЮ, 46 обр.), ландрас (ЛА, 110 обр.), йоркшир (ЙО, 77 обр.), белорусская крупная белая (БКБ, 49 обр.) и белорусская мясная (БМ, 46 обр.). Образцы животных были отобраны сотрудниками селекционно-гибридных центров «Заднепровский», «Полесье-Агро» и «Жоди́ноАгроПлемЭлита».

Выделение ДНК

ДНК из образцов ушных выщипов выделяли с использованием набора ДНК-сорб-Б (Прайм-тех, Беларусь) в соответствии с рекомендациями производителя.

KASP

Определение генотипа по SNP осуществ-

ляли с использованием технологии, основанной на конкурентной аллель-специфической ПЦР (KASP, Kompetitive allele specific PCR). Генотипирование проводили с использованием KASP Assay mix (KASP by Design, KBD) и KASP Master mix (LGC Biosearch Technologies, Великобритания; ООО «Максим Медикал», Россия) в двукратной повторности. ПЦР проводили в объеме 10 мкл в термоциклире Applied Biosystems QuantStudio 5 Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific, США) согласно имеющимся рекомендациям.

Определение генома *in silico*

Генотипы *in silico* для животных, геномы которых были представлены в открытом доступе в NCBI, которые дополнительно конвертировали в формат *.fasta с помощью пакета SRA-Toolkit v.2.11, определяли с использованием оригинального программного обеспечения GenIS, написанного на языке Pythonv3.10 [24].

В биоинформатическом анализе были задействованы 248 особей вида *S. scrofa domesticus* (дюрок — 85, ландрас — 46, крупная белая — 70, пьетрен — 28, йоркшир — 19), «сырые» данные полных геномов которых расположены в базе Sequence Read Archive (SRA, [25]): PRJEB1683 (2013, Wageningen University & Research, Нидерланды), PRJNA260763 (2014, Seoul National University и NICEM — Южная Корея, BGI — КНР), PRJNA255085 (2014, Centre For Research in Agrigenomics, Испания), PRJEB9922 (2015, Wageningen University & Research, Нидерланды), PRJNA309108 (2016, Novogene, США), PRJNA322309 (2016, China Agricultural University, КНР), PRJNA358108 (2016, China Agricultural University, КНР), PRJNA343658 (2016, USDA-ARS-USMARC, США), PRJNA378496 (2017, China Agricultural University, КНР), PRJNA393920 (2017, INRA, Франция), PRJNA487172 (2018, Huazhong Agricultural University, КНР), PRJNA506339 (2018, University of Edinburgh, Шотландия), PRJNA507853 (2018, Sichuan Agricultural University, Китай), PRJNA485589 (2018, Agricultural Genome Institute at Shenzhen, КНР), PRJNA488960 (2018, Huazhong Agriculture University, КНР), PRJEB30282 (2019, Queen Mary University of London, Великобритания), PRJNA520978 (2019, Centre for Research in Agricultural Genomics, Испания), PRJNA550237 (2019, Jiangxi Agricultural University, КНР),

PRJNA553106 (2019, Georg-August-University Goettingen, Германия), PRJNA622908 (2020, ETH Zurich, Германия), PRJNA626370 (2020, Centre for Research in Agricultural Genomics, Испания), PRJNA671763 (2020, Chinese Academy of Agricultural Sciences, КНР), PRJNA712489 (2021, China Agricultural University, КНР).

Статистический анализ данных

Дифференцирующий потенциал SNP определяли с использованием ROC-анализа в SPSS v.20.0. При наличии нижней границы асимптотического 95% доверительного интервала более 0,8 для параметра AUC (площадь под кривой) полиморфизм позиционировался как генетический маркер с высоким дифференцирующим потенциалом. Вероятность отнесения образца к одной из групп рассчитывали с использованием логистической регрессии.

Комплексную оценку дифференцирующего потенциала для совокупности SNP проводили с использованием программы MDR v. 3.0.2 [21]. Вклад конкретного генотипа определялся величиной энтропии H (выраженной в процентах). При $H = 100\%$ генотип способен однозначно дифференцировать, к какой группе (породе) относится образец. В программе MDR в результате множественных перестановок (пермутаций) первичных данных определяется наиболее оптимальная модель дифференциации.

В процессе моделирования были использованы высоко консервативные настройки поиска конфигурации модели, которые позволили однозначно дифференцировать наличие/отсутствие статистически значимых эффектов, а именно: количество атрибутов (attribute count range) — от 1 до n (где n — количество переменных в модели); воспроизводимость модели (cross-validation count) — 100; анализ топ-моделей (track top models) — 1 000; поиск конфигурации модели (search method configuration) — всесторонний (exhaustive); метод сравнения (ambiguous cell analysis) — точный тест Фишера (Fisher's exact test); классификация ячеек (ambiguous cell assignment) — неклассифицированные (unclassified). Корректность модели оценивали по значению сбалансированной точности (Balanced Accuracy), которая зависит от чувствительности и специфичности модели.

Результаты и обсуждения

На биоинформатическом этапе был сфор-

мирован максимально широкий перечень потенциально информативных SNP, в который вошли как ранее описанные SNP [22], так и фланкирующие их SNP из Axiom® Porcine Genotyping Array (Axiom_PigHDv1) от Affymetrix®, а также SNP, для которых по состоянию на 2021 г. имелась доказанная ассоциация с QTL (Quantitative Trait Locus) и была представлена информация в Pig Quantitative Trait Locus Database (Pig QTLdb [26]). Определение генотипа *in silico* с помощью программы GenS было осуществлено по 7 451 SNP для 248 животных вида *S. scrofa domesticus* [23].

Полученные результаты легли в основу математического анализа классификаций с применением ROC-кривых (receiver operating characteristic), также известных как кривые ошибок. Количественную интерпретацию ROC дает показатель AUC (area under ROC curve) — площадь, ограниченная ROC-кривой и осью доли ложных положительных классификаций. Чем выше показатель AUC, тем качественнее осуществляется классификация, при этом значение 0,5 демонстрирует непригодность выбранного метода классификации.

Для свиней породы дюрок нами выявлены 39 SNP с высоким дифференцирующим потенциалом, для которых значение асимптотической значимости для AUC оказалось $<1 \times 10^{-10}$. Значение AUC составило 0,732–0,831. При этом частота породоспецифичного аллеля для данных SNP находилась в диапазоне 68,3–96,4%.

Мы считаем, что для создания модели определения чистопородности свиней с использованием молекулярно-генетического анализа должно быть включено небольшое количество генетических маркеров, оптимальное количество SNP для решения данной задачи — не более 5. Поэтому для достижения данной цели необходимо было с использованием статистических методов редуцировать общее количество выявленных нами SNP до логически и экономически приемлемого количества, оставив в модели наиболее значимые комбинации SNP с наивысшим дифференцирующим потенциалом. Также для создания универсальной системы дифференциации наиболее корректным будет решение включить в тест-систему SNP, расположенные на разных хромосомах, чтобы избежать сложностей, со-

пряженных с совместным наследованием генетических маркеров.

Построение модели взаимодействий SNP для определения минимального и достаточного количества генетических маркеров для решения поставленной цели проводилось с использованием биоинформатического метода многомерного сокращения размерности (MDR v.3.0.2) на массиве генотипов, полученных в процессе биоинформатического анализа данных SRA. В результате проведенного анализа была определена модель, включающая SNP rs80859281 (Chr.14:99099156C > T, Scrofa11.1 (GCF_000003025.6), ген *ASAH2*); rs80967182 (Chr.7:106301845A > G); rs81333725 (Chr.8:47482649G > T, ген *RXFP1*) и rs81458130 (Chr.16:32192496C > T, ген *ITGAI*). Данная модель характеризовалась высокими значениями точности (96,3%), специфичности (94,1%) и чувствительности (98,5%).

Впоследствии для данных SNP с использованием технологии KASP определены генотипы для 328 образцов биологического материала (ушной выщип) свиней пяти пород. Результаты молекулярно-генетического анализа представлены в таблице 1.

Наибольший дифференцирующий потенциал был определен для **rs80967182** (AUC = 0,972; 95%ДИ = [0,955–0,989];

$p = 9,08E-25$); **rs80859281** (AUC = 0,934; 95%ДИ = [0,876–0,991]; $p = 4,02E-21$); **rs81333725** (AUC = 0,928; 95%ДИ = [0,900–0,956]; $p = 1,28E-20$); **rs81458130** (AUC = 0,858; 95%ДИ = [0,786–0,930]; $p = 2,28E-08$).

Частота распространенности аллеля А для rs80967182 в выборке ДЮ составила 91,3%; для остальных пород она варьировала в диапазоне 2,6–21,7%. Частота распространенности аллеля Т для rs80859281 в выборке ДЮ составила 60,7%; в выборке ЙО — 0,6%, для остальных пород аллель Т отсутствовал. Для rs81333725 и rs81458130 разница между частотой распространенности аллелей была менее выраженной.

Графическая интерпретация модели представлена на рисунке 1. Согласно полученным результатам, сбалансированная точность дифференциации (adj. Balanced accuracy) свиней породы дюрок и других пород (ландрас, йоркшир, белорусская крупная белая и белорусская мясная) при анализе 328 образцов по трем SNP — rs80859281, rs80967182 и rs81333725 — составила 98,37% (специфичность модели — 100%, чувствительность — 100%). В среднем в 6,4% случаев особь не удалось отнести ни к одному кластеру с заявленным в MDR-уровнем точности в 99,0%.

Таблица 1

Результаты генотипирования для особей пяти пород свиней по исследуемым SNP

SNP	Генотип	Порода свиней				
		ДЮ (n = 46)	ЛА (n = 110)	ЙО (n = 77)	БКБ (n = 49)	БМ (n = 46)
rs80859281	CC	6 (13,0%)	110 (100%)	76 (98,7%)	49 (100%)	46 (100%)
	CT	24 (52,2%)	–	1 (1,3%)	–	–
	TT	16 (34,8%)	–	–	–	–
rs80967182	AA	38 (82,6%)	–	–	3 (6,1%)	3 (6,5%)
	AG	8 (17,4%)	24 (21,8%)	4 (5,2%)	7 (14,3%)	14 (30,4%)
	GG	–	86 (78,2%)	73 (94,8%)	39 (79,6%)	29 (63,0%)
rs81333725	GG	45 (97,8%)	10 (9,1%)	2 (2,6%)	10 (20,4%)	16 (34,8%)
	GT	1 (2,2%)	27 (24,5%)	12 (15,6%)	22 (44,9%)	21 (45,7%)
	TT	–	73 (66,4%)	63 (81,8%)	17 (34,7%)	9 (19,6%)
rs81458130	CC	28 (60,9%)	52 (47,3%)	7 (9,1%)	5 (10,2%)	3 (6,5%)
	CT	18 (39,1%)	53 (48,2%)	27 (35,1%)	21 (42,9%)	25 (54,3%)
	TT	–	5 (4,5%)	43 (55,8%)	23 (46,9%)	18 (39,1%)

Примечание. в пустых ячейках генотип не выявлен

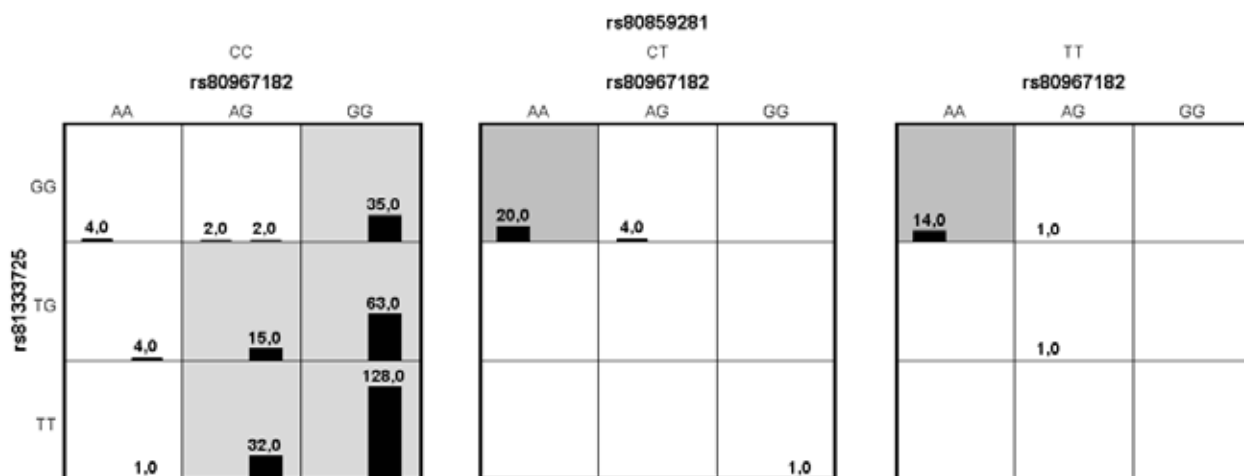


Рис. 1. Графическое представление модели из трех полиморфизмов для дифференциации дюрока от других пород свиней, адаптировано из ПО MDR v.3.0.2 (в каждой ячейке цифра слева — абсолютное количество свиней породы дюрок, цифра справа — абсолютное количество особей свиней других пород)

Вклад каждого полиморфизма в дифференциацию свиней породы дюрок и других пород характеризуется величиной энтропии H (выраженной в процентах). Максимальное значение H было выявлено для rs80859281 (43,82%), rs80967182 (40,61%) и rs81333729 (30,93%). Аддитивный эффект для трех полиморфизмов составил 52,18%.

В то же время, при оценке точности отнесения образца к одной из двух групп: дюрок («Дюрок») или другие породы («Другие породы»), с использованием логистической регрессии, получены следующие данные: при наличии генотипа CC (rs80859281) / GG (rs80967182) / TT (rs81333725) вероятность отнесения образца к группе «Другие породы» составляет 100% (распространенность особей с данным генотипом в группе — 45,4%); при наличии генотипа CC (rs80859281) / GG (rs80967182) / TG (rs81333725) — 100% (распространенность — 22,3%); при наличии генотипа CC (rs80859281) / AG (rs80967182) / TT (rs81333725) — 100% (распространенность — 11,3%); при наличии генотипа CC (rs80859281) / AG (rs80967182) / TG (rs81333725) — 100% (распространенность — 5,3%); при наличии генотипа CC (rs80859281) / GG (rs80967182) / GG (rs81333725) — 98,6% (распространенность особей с данным генотипом в группе — 12,4%); при наличии генотипа CT (rs80859281) / AA (rs80967182) / GG (rs81333725) вероятность отнесения образца к группе «Дюрок» состав-

ляет 100% (распространенность — 43,5%); при наличии генотипа TT (rs80859281) / AA (rs80967182) / GG (rs81333725) вероятность отнесения образца к группе «Дюрок» составляет 100% (распространенность — 30,4%).

Особого внимания заслуживают четыре особи с генетическим профилем CC (rs80859281) / AG (rs80967182) / GG (rs81333725), две из которых относятся к породе белорусская мясная. Дифференцировать этих свиней и дюрока с использованием трех полиморфизмов оказалось невозможно. Предположительно, данные особи являются отдаленными гибридами с генетическими корнями от дюрока. Возможно, в дальнейшем анализ этих образцов с использованием STR-локусов подтвердит данное предположение.

Необходимо отметить, что сбалансированная точность дифференциации свиней породы дюрок составила более 95%, данного показателя вполне достаточно для решения большинства задач биологической направленности, например, в контексте популяционных исследований или селекционной направленности. В то же время в 6,4% случаев (согласно модели, рис. 1) образцы не представляется дифференцировать с уровнем значимости $p < 0,01$. Если уменьшить порог точности до $p < 0,05$, то количество дифференцированных особей уменьшится до 2,4%. В этом случае точность модели составит 99,2% при специфичности в 99,6% и чувствительности в 100%.

В перспективе, для дальнейшего увеличе-

ния точности модели (например, при импорте свиней для селекции), может быть применено как увеличение выборки исследуемых пород за счет включения новых образцов с заведомо известной породной принадлежностью, по результатам генетического исследования (например, анализ STR-локусов), так и добавление в предложенную нами модель новых SNP с высоким дифференцирующим потенциалом

Заключение

В рамках проведенного исследования предложена тест-система по дифференциации свиней породы дюрок от других пород (ландрас, крупная белая, пьетрен, йоркшир, в том числе белорусская крупная белая, белорусская мясная). Так, с использованием методов биоинформатики определены 39 SNP с высоким дифференцирующим потенциалом, а также на практическом материале подтвержден высокий дифференцирующий потенциал выявленных полиморфных вариантов. На основании результатов молекулярно-генетического анализа 328 образцов предложена тест-модель из трех SNP: rs80859281 (Chr.14:99099156C > T, Sscrofa11.1 (GCF_000003025.6), ген *ASAH2*); rs80967182 (Chr.7:106301845A > G); rs81333725 (Chr.8:47482649G > T, ген *RXFPI*), сбалансированная точность которой при уровне значимости $p < 0,01$ составляет не менее 98,4%; при $p < 0,05$ — не менее 99,2%.

Предложенная нами схема для дифференциации выгодно отличается своей универсальностью (с позиций методологического подхода возможно использовать различную приборную базу для ПЦР в реальном времени или ридеры флуоресцентного сигнала), а также высокой точностью и специфичностью. Молекулярно-генетический анализ с использованием KASP призван сократить временные и финансовые затраты на ДНК-тестирование, а также снизить риск кросс-контаминации, т. к. процесс является одностадийным (исключены этапы рестрикции и электрофореза).

В целом, расширение базы анализируемых образцов и включение в тест-систему дополнительных SNP для идентификации, в том числе и гибридов, продолжает оставаться актуальной задачей.

Исследование выполнено в рамках ГПНИ

«Биотехнологии-2», подпрограмма «Геномика, эпигеномика, биоинформатика» на 2021–2025 гг., задание «Разработка системы генетического анализа для определения чистопородности свиней на основе изучения SNP-локусов» (2021–2023 гг.)

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список использованных источников

1. Dekkers, J. C. Marker-assisted selection for commercial crossbred performance / J. C. Dekkers // *Journal of animal science*. – 2007. – Vol. 85 (9). – P. 2 104–2 114. – DOI: 10.2527/jas.2006-683
2. A genome-wide association study for a proxy of intermuscular fat level in the Italian Large White breed identifies genomic regions affecting an important quality parameter for dry-cured hams / L. Fontanesi [et al.] // *Animal genetics*. – 2017. – Vol. 48 (4). – P. 459–465. – DOI: 10.1111/age.12542
3. PorcineSNP60 DNA Analysis Kit v3 [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.illumina.com/products/by-type/microarray-kits/porcine-snp60.html>. – Дата доступа: 28.08.2023.
4. Identification of high utility SNPs for population assignment and traceability purposes in the pig using high-throughput sequencing / A. M. Ramos [et al.] // *Animal genetics*. – 2011. – Vol. 42 (6). – P. 613–620. – DOI: 10.1111/j.1365-2052.2011.02198.x
5. Genome-wide association study for ham weight loss at first salting in Italian Large White pigs: towards the genetic dissection of a key trait for dry-cured ham production / L. Fontanesi [et al.] // *Anim. Genet.* – 2017. – Vol. 48 (1). – P. 103–107. – DOI: 10.1111/age.12491
6. Genetic diversity analysis of two commercial breeds of pigs using genomic and pedigree data / R. Zanella [et al.] // *Genet. Sel. Evol.* – 2016. – Vol. 30. – P. 1–10. – DOI: 10.1186/s12711-016-0203-3
7. Genome-wide study on intramuscular fat in Italian Large White pig breed using the PorcineSNP60 BeadChip / R. Davoli [et al.] // *J. Anim. Breed Genet.* – 2016. – Vol. 133 (4). – P. 277–282. – DOI: 10.1111/jbgs.12189

8. A genome-wide association study in large white and landrace pig populations for number piglets born alive / S. Bergfelder-Drüing [et al.] // PLoS One. – 2015. – Vol. 10 (3). – P. 1–19. – DOI: 10.1371/journal.pone.0117468
9. A genomewide association study for average daily gain in Italian Large White pigs / L. Fontanesi [et al.] // J. Anim. Sci. – 2014. – Vol. 92 (4). – P. 1 385–1 394. – DOI: 10.2527/jas.2013-7059
10. A genome-wide association study to detect QTL for commercially important traits in Swiss Large White boars / D. Becker [et al.] // PLoS One. – 2013. – Vol. 8 (2). – P. 1–6. – DOI: 10.1371/journal.pone.0055951
11. Development of a genetic tool for product regulation in the diverse British pig breed market / S. Wilkinson [et al.] // BMC Genomics. – 2012. – Vol. 15. – P. 1–12. – DOI: 10.1186/1471-2164-13-580
12. Using SNP array data to test for host genetic and breed effects on Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Viremia / S. Biffani [et al.] // BMC Proc. – 2011. – Vol. 5 (Suppl 4). – P. 1–4. – DOI: 10.1186/1753-6561-5-S4-S28
13. Estimation of U.S. Yorkshire breed composition using genomic data / Y. Huang [et al.] // J. Anim. Sci. – 2014. – Vol. 92 (4). – P. 1 395–1 404. – DOI: 10.2527/jas.2013-6907
14. Uimari, P. Whole-genome SNP association analysis of reproduction traits in the Finnish Landrace pig breed / P. Uimari, A. Sironen, M. L. Sevón-Aimonen // Genet. Sel. Evol. – 2011. – Vol. 43 (1). – P. 1–8. – DOI: 10.1186/1297-9686-43-42
15. Multi-breed genome-wide association study reveals novel loci associated with the weight of internal organs / Y. He [et al.] // Genet. Sel. Evol. – 2015. – Vol. 47 (87). – P. 1–9. – DOI: 10.1186/s12711-015-0168-7
16. Investigations on the pattern of linkage disequilibrium and selection signatures in the genomes of German Piétrain pigs / P. Stratz [et al.] // J. Anim. Breed Genet. – 2014. – Vol. 131 (6). – P. 473–482. – DOI: 10.1111/jbg.12107
17. Roberts, K. S. Relationships among and variation within rare breeds of swine / K. S. Roberts, W. R. Lamberson // J. Anim. Sci. – 2015. – Vol. 93 (8). – P. 3 810–3 813. – DOI: 10.2527/jas.2015-9001
18. Оценка интрогрессии генов свиньи домашней (*Sus scrofa domesticus*) в генофонд дикого кабана (*Sus scrofa scrofa*) на основе исследования полиморфизма генов *MC1R* и *NR6A1* / В. Н. Кипень [и др.] // Молекулярная и прикладная генетика / Институт геноетики и цитологии НАН Беларуси ; редкол. А. В. Кильчевский (гл. ред.) [и др.]. – Минск, 2019. – Т. 26. – С. 83–95.
19. Animal Genetic Resources in China Pigs / L. Y. Wang [et al.] // Beijing: Chinese Agriculture Press. – 2011. – P. 25–29.
20. Genomic Analysis To Identify Signatures of Artificial Selection and Loci Associated with Important Economic Traits in Duroc Pigs / Yunlong Ma [et al.] // G3 (Bethesda, Md.). – 2018. – Vol. 8 (11). – P. 3 617–3 625. – DOI: 10.1534/g3.118.200665
21. Multifactor-dimensionality reduction reveals high-order interactions among estrogen-metabolism genes in sporadic breast cancer / M. D. Ritchie [et al.] // Am. J. Hum. Genet. – 2001. – Vol. 69(1). – P. 138–147. – DOI: 10.1086/321276
22. Analysis of HEPH Gene Polymorphism on the X Chromosome for Identification of Wild Boar and Domestic Pig / V. N. Kipen [et al.] // Russian Journal of Genetics. – 2020. – Vol. 56. – P. 1 099–1 108. – DOI: 10.1134/S1022795420080062
23. Дифференциация пород домашних свиней с использованием расширенного биоинформатического анализа SNP / В. Н. Кипень [и др.] // Доклады Национальной академии наук Беларуси. – 2022. – Т. 66. – № 3. – С. 301–309. – DOI: 10.29235/1561-8323-2023-67-2-119-125
24. GENIS — методологический подход для генотипирования *in silico* (апробация на результатах секвенирования для *Sus scrofa*) / В. Н. Кипень, Е. В. Снытков // Математическая биология и биоинформатика. – 2024. – № 19(1). – С. 36–51. – DOI: 10.17537/2024.19.36
25. Sequence Read Archive [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra>. – Дата доступа: 01.09.2023.
26. Pig Quantitative Trait Locus Database [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.animalgenome.org>. – Дата доступа: 01.09.2023.

V. N. Kipen, E. V. Snytkov, M. E. Mikhailova, R. I. Sheyko

DIFFERENTIATION OF PIG BREEDS USING KASP TECHNOLOGY — TEST-SYSTEM FOR DUROC

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

Using the biological material (the earmarks of the following pig breeds: Belarusian Large White, Belarusian Meat, Duroc, Landrace, Yorkshire), the high differentiating potential of the polymorphic variants rs80967182, rs81333725 (*RXFPI*) and rs80859281 (*ASAH2*) for the differentiation of Duroc pigs from other breeds was established. The test model consisting of three single nucleotide polymorphisms, which is characterized by the high values of accuracy (98.4%), specificity and sensitivity, was proposed for the identification of Duroc pigs. Using KASP, a quick and simple approach to differentiation was developed based on the proposed test model, which is destined to reduce the time and financial costs of molecular genetic analysis, as well as the risk of cross-contamination since the process is one-stage (restriction and electrophoresis stages are excluded).

Keywords: *Sus scrofa domesticus*, single nucleotide polymorphism, differentiation, kompetitive allele-specific PCR (KASP), *in silico* genotyping.

Дата поступления в редакцию: 07 сентября 2023 г.

О. М. Малышева, Е. П. Михаленко, О. Ч. Мазур, А. В. Кильчевский

ВАРИАБЕЛЬНОСТЬ ГЕНОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ С БРОНХОЛЕГОЧНОЙ ДИСПЛАЗИЕЙ И РЕТИНОПАТИЕЙ У НЕДОНОШЕННЫХ НОВОРОЖДЕННЫХ

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

Бронхолегочная дисплазия (БЛД) и ретинопатия недоношенных (РН) являются наиболее распространенными патологическими состояниями недоношенных новорожденных. Заболевания имеют многофакторную этиологию со значительным генетическим компонентом. У 59 недоношенных новорожденных срока гестации 28–36 недель с использованием полноэкзомного секвенирования (whole exome sequencing, WES) определен спектр из 376 нуклеотидных вариантов кодирующих областей 88 генов, ассоциированных с развитием БЛД и РН, из них 126 вариантов с $MAF < 0,01$. Редкие варианты с патогенным эффектом или неопределенной клинической значимостью выявлены у младенцев с РН (rs138792485 гена *TLR6*, вариант p.Gln101Ter гена *TIRAP*, rs104894223 и rs773474310 гена *FZD4*, rs368951368 гена *AGTR1*, rs111513627 гена *TGFBR1*, rs80265967 гена *SOD1*). Используя метод поиска вариантов, связанных с мультифакториальными заболеваниями в когортах ограниченного размера, выявлены предварительные статистически значимые различия по распределению частот генотипов вариантов rs323043 *ABCA3*, rs2227984 *EGFR*, rs1965707 *SFTPA2* между младенцами с БЛД и недоношенными новорожденными без БЛД.

Ключевые слова: вариант нуклеотидной последовательности, недоношенные новорожденные, бронхолегочная дисплазия, ретинопатия недоношенных, полноэкзомное секвенирование.

Введение

Бронхолегочная дисплазия (БЛД) и ретинопатия недоношенных (РН) относятся к наиболее распространенным осложнениям неонатального периода новорожденных, которые оказывают долгосрочное влияние на здоровье ребенка (повышенная восприимчивость к инфекциям верхних дыхательных путей, легочная гипертензия, бронхиальная астма, отслойка сетчатки, снижение остроты зрения, слепота).

Незрелость легких и недостаточное количество сурфактанта для обеспечения полноценной вентиляции и газообмена, низкий уровень антиоксидантной и иммунной защиты, а также высокая концентрация кислорода и его токсичность, баротравма вследствие проводимой искусственной вентиляции легких и инфекции являются основными факторами развития БЛД [1, 2]. Терапевтическое использование дополнительного кислорода у недоношенных новорожденных запускает патологические процессы в незрелой сосудистой сети сетчатки:

на первой стадии образование новых сосудов подавляется, на второй — происходит их аномальная пролиферация, деформация сетчатки с последующей отслойкой [3].

БЛД и РН являются многофакторными заболеваниями, на развитие которых оказывают влияние пренатальные условия, постнатальные факторы, оказываемая терапия и генетическая детерминанта, на долю которой приходится более половины различий в предрасположенности к развитию заболевания [2, 3]. Несмотря на то, что знания о патогенезе осложнений значительно улучшились в последнее время, механизмы, которые к ним приводят, до конца не изучены.

В течение последнего десятилетия широкое применение методов полногеномного анализа ассоциаций и полноэкзомного секвенирования позволило выявить потенциальные генетические факторы (гены-кандидаты, отдельные генетические варианты) риска развития БЛД и РН. Обнаруженные ассоциации не достиг-

ли общегеномного значения, вероятно, из-за гетерогенности заболеваний, включая потенциальные различия в генетической структуре БЛД и РН между этническими группами [2–4].

Цель исследования заключалась в поиске клинически значимых вариантов нуклеотидной последовательности генов, ассоциированных с развитием БЛД и РН у недоношенных новорожденных, с использованием технологии WES.

Материалы и методы

В исследование включены 59 образцов ДНК недоношенных новорожденных срока гестации 28–36 недель, родившихся в УЗ «Клинический родильный дом Минской области». На проведение исследования получено разрешение Комитета по этике «Института повышения квалификации и переподготовки кадров здравоохранения учреждения образования «Белорусский государственный медицинский университет» (ИПКипКЗ УО БГМУ), а также для всех пациентов оформлено письменное информированное согласие законного представителя на участие в эксперименте.

Исследуемая выборка детей представлена 17 новорожденными с диагностированными БЛД и РН, 10 — с БЛД, 15 — с РН, 17 — без БЛД и РН. Критериями включения в экспериментальную группу были наличие клинически (кислородная поддержка более 28 дней) и рентгенологически подтвержденной БЛД у ребенка и/или РН различной степени тяжести, отсутствие врожденных пороков развития и наследственных заболеваний. Клинический диагноз поставлен сотрудниками кафедры неонатологии ИПКипКЗ УО БГМУ.

Геномная ДНК выделена из венозной крови методом фенол-хлороформной экстракции. Полноэкзомное секвенирование выполнено по гибриднему протоколу Illumina DNA prep with enrichment / xGen™ hybridization capture of DNA libraries (Illumina / IDT) на приборе NextSeq 550 (Illumina).

Обработка первичных данных, получение прочтений с дальнейшим их выравниванием на целевые участки референсного генома (hg19) осуществлена с помощью онлайн-приложений Dragen FASTQ Toolkit и Dragen germline pipeline (BaseSpace, Illumina); фильтрация, аннотирование, верификация и ин-

терпретация вариантов — с помощью программных средств wANNOVAR, Integrative Genomics Viewer, MS Excel 2016.

Первичная фильтрация обнаруженных полиморфных вариантов заключалась в исключении из анализа некодирующих (интронных) замен, замен с глубиной прочтения менее 10 и не удовлетворяющих фильтрам качества (Pass-filter). Также выполнена фильтрация по набору генов. По имеющимся литературным источникам [2–6], базам данных MalaCards и DisGeNET были подобраны 88 генов, ассоциированных с исследуемыми осложнениями неонатального периода недоношенных детей (6 генов — с РН, 14 — с БЛД, 68 генов с двумя осложнениями), в их числе гены метаболизма сурфактанта, ремоделирования тканей, развития сосудов, ренин-ангиотензиновой системы (renin-angiotensin system, RAS), гены, связанные с антиоксидантной защитой, с иммунной системой и воспалением, факторами роста, их рецепторами и регуляторами, а также гены Wnt/ β -катенин-сигнального пути развития сетчатки (рис. 1).

Для поиска вариантов, потенциально повышающих восприимчивость к БЛД и РН, были использованы два подхода: отбор нуклеотидных замен с частотой минорного аллеля (minor allele frequency, MAF) $\geq 0,01$ по базам данных ExAC и GnomAD (genomes, exomes) и определение статистически значимых ассоциаций генетического варианта и осложнения; отбор нуклеотидных замен с MAF $< 0,01$ (редкие) по базам данных ExAC и GnomAD, с умеренным и высоким прогнозируемым функциональным воздействием в соответствии с SnpEff (несинонимичное кодирование, вставки или делеции кодонов, приобретение или потеря стоп-кодонов, варианты со сдвигом рамки считывания, потеря стартовых кодонов), клинически значимых вариантов по ClinVar и программам предсказания патогенности (интернет-портал VarSome).

Статистическая обработка результатов исследования проводилась с использованием статистического пакета MS Excel 2016. Уровень значимости p определяли с поправкой Йетса. Статистически значимыми различия считались при $p < 0,05$. По величине показателя отношения шансов и 95% доверительного интервала (confidence interval, CI) судили об ассоциации генотипа с развитием осложнения.

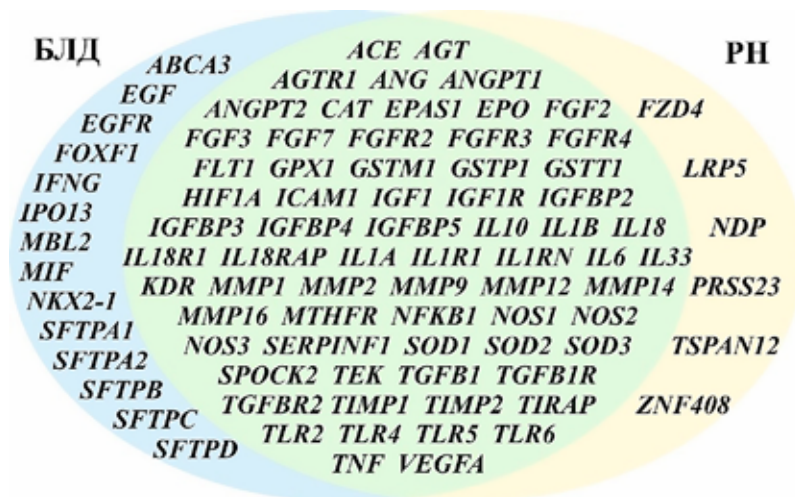


Рис. 1. Гены, ассоциированные с развитием БЛД и РН у недоношенных новорожденных (цветовая индикация ассоциации гена с осложнением неонатального периода: голубой — БЛД, желтый — РН, зеленый — два осложнения)

Результаты и обсуждение

Проанализированы кодирующие области 88 генов, в 78 из которых обнаружено 376 вариантов нуклеотидной последовательности с альтернативными аллелями, из них 126 с $MAF < 0,01$ (рис. 2).

При этом среднее количество вариантов нуклеотидной последовательности на один образец ДНК пациента по всем изученным генам составило 83 ± 7 .

В генах *FGF7*, *FOXF1*, *IFNG*, *MIF*, *MMP16*, *NKX2-1*, *IGF1*, *IL10*, *TNF*, *NDP* в 59 образцах ДНК исследуемой выборки замен с альтернативными аллелями обнаружено не было.

Выявленные замены преимущественно представлены синонимичными и несинонимичными вариантами, соотношение которых в группе с $MAF \geq 0,01$ составляет 60% к 40%, а среди редких замен — 40% к 60%. В числе обнаруженных вариантов также присутствуют две делеции и две инсерции без сдвига рамки считывания, две нонсенс-замены, одна делеция со сдвигом рамки считывания.

Определение риска развития БЛД и РН у недоношенных новорожденных по вариантам нуклеотидной последовательности с $MAF < 0,01$

В исследуемой группе недоношенных новорожденных выявлено 126 нуклеотидных замен с $MAF < 0,01$. В генах, ассоциированных с развитием БЛД, обнаружено 18 редких вариантов, с РН — 13 вариантов, с обоими осложнениями — 95. На рисунке 3 показано распределе-

ние редких вариантов нуклеотидной последовательности у пациентов в изучаемых группах.

Большая часть редких вариантов нуклеотидной последовательности (97 замен) выявлена единично, оставшиеся встречались в 2–8 исследуемых образцах. Среди несинонимичных вариантов нуклеотидной последовательности, выявленных в двух и более образцах недоношенных новорожденных с осложнениями и отсутствующих у детей без БЛД и РН, обнаружены замены rs61735104 гена *FGFR3*, rs34216045 гена *IL18R1* и rs79487279 гена *NOS1* (доброкачественные по базе данных ClinVar и программам предсказания патогенности *in silico*), и вариант rs11549467(с.1762G > A, р.Ala588Thr) гена *HIF1A*, клиническая значимость которого по ClinVar не определена. Индуцируемый гипоксией фактор 1 (HIF1) является важным регулятором кислородного гомеостаза, обеспечивающим адаптивные реакции на гипоксию. Ген *HIF1A* кодирует одну из двух субъединиц (HIF-1 α) этого фактора. В условиях недостатка кислорода субъединица HIF-1 α не разрушается, HIF1 накапливается, что приводит к усилению регуляции многочисленных генов (например, *VEGFA*), участвующих в различных биологических процессах, включая гликолиз, ангиогенез и эритропоэз. Нуклеотидная замена с.1762G > A расположена в пределах домена, стабилизирующего субъединицу HIF-1 α от деградации. По литературным данным альтернативный аллель А является независимым фактором защиты от

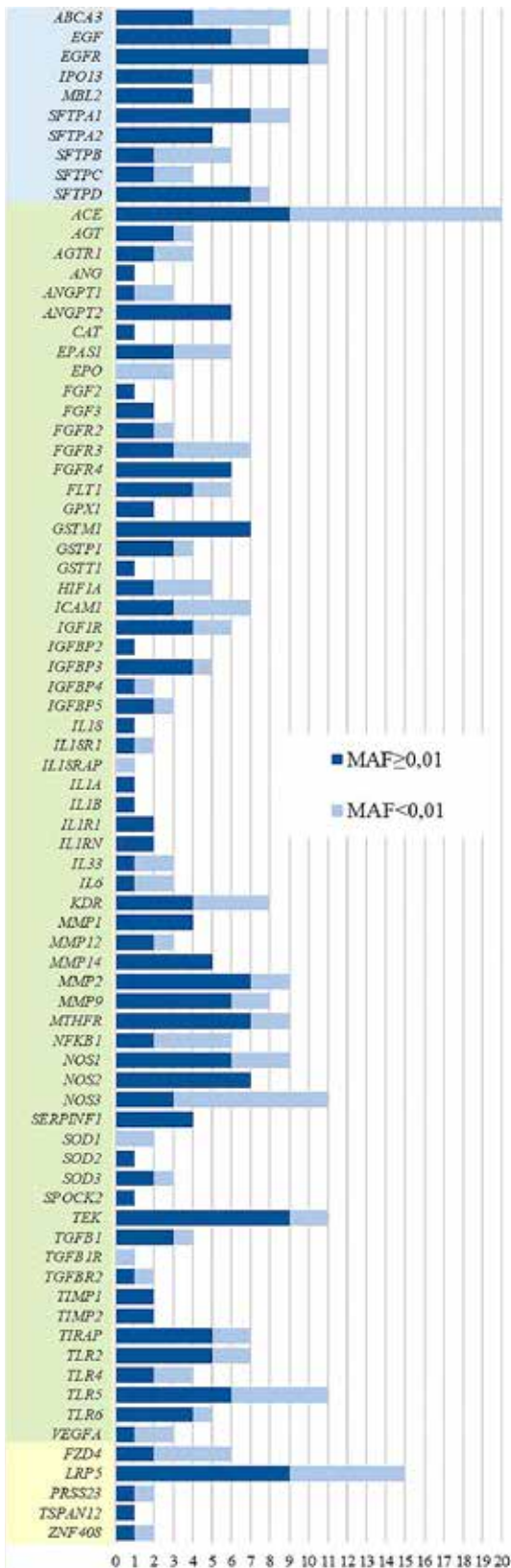


Рис. 2. Распределение выявленных нуклеотидных замен по генам (цветовая индикация ассоциации гена с осложнением неонатального периода: голубой — БЛД, желтый — РН, зеленый — два осложнения)

синдрома дыхательного расстройства недоношенных новорожденных [7]. Данный вариант в нашей выборке определен у пациента с двумя осложнениями (БЛД и РН). Можно предположить, что изменение структуры и/или экспрессии *HIF1A* способствует развитию второй фазы РН, когда происходит аномальная неоваскуляризация сетчатки.

Среди генов, ассоциированных с развитием и БЛД, и РН, большее количество редких замен выявлено в гене *NOS3* и *EPAS1*, с развитием РН — в генах *FZD4*, *LRP5* (по разнице между количеством замен в основной и контрольной группе). Данные гены кодируют белки, участвующие в развитии сосудов.

Ген *NOS3* кодирует эндотелиальную синтазу оксида азота, которая принимает участие в синтезе оксида азота в эндотелии, действующем как сосудорасширяющее средство, обеспечивая адекватный кровоток через ткани. Оксид азота также оказывает защитное действие на стенки сосудов, ингибируя окисление липидов и инактивируя свободные радикалы кислорода [8]. Снижение экспрессии *NOS3* ухудшает VEGF-опосредованный ангиогенез и неоваскуляризацию [9]. Снижение экспрессии гена *EPAS1*, кодирующего эндотелиальный белок домена PAS 1, приводит к нарушению экспрессии гена эритропоэтина, который стимулирует образование красных кровяных телец в костном мозге, что вызывает уменьшение устойчивости к гипероксической терапии у недоношенного новорожденного и повышение восприимчивости к РН [10].

Гены *FZD4* и *LRP5* кодируют рецепторы Wnt/ β -катенин-сигнального пути. Их взаимодействие с лигандом норрином активирует нижележащий каскад реакций, в результате чего происходит инициация экспрессии генов, ответственных за васкуляризацию сетчатки. Мутации в гене *FZD4* и *LRP5* обеспечивают ~10% случаев тяжелой формы РН у недоношенных новорожденных [10].

Особый интерес представляют 40 редких одонуклеотидных несинонимичных гетерозиготных замен, обнаруженных единожды у детей с БЛД и/или РН и отсутствующих в группе сравнения (табл. 1).

По клинической значимости 16 из представленных вариантов классифицируются как варианты с неопределенным клиническим

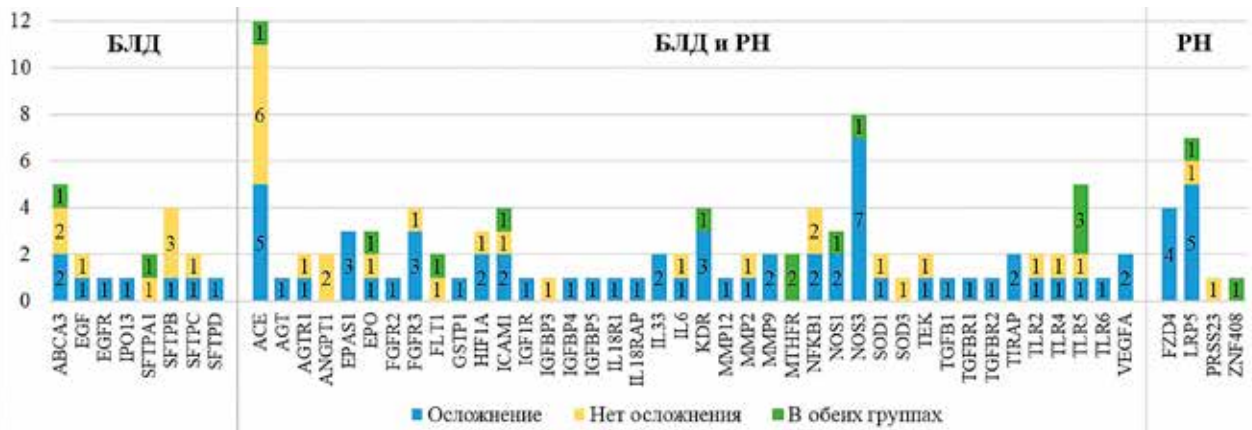


Рис. 3. Распределение редких вариантов нуклеотидной последовательности по изучаемым группам генов

значением (VUS) либо их интерпретация конфликтная (при отсутствии информации в базе данных ClinVar были использованы программы предсказания патогенности *in silico*). В генах, ассоциированных с развитием БЛД, выявлены две такие замены: rs148671332 в гене *ABCA3* и rs781195445 в гене *SFTPD*.

Ген *ABCA3* кодирует АТФ-зависимый транспортер сурфактанта А3, который преимущественно экспрессируется в легочной ткани, локализуется на мембранах пластинчатых телец альвеолоцитов II типа, где имеет решающее значение для синтеза (транспортирует фосфолипиды) и процессинга сурфактанта. Мутации в гене *ABCA3* связаны с нарушением метаболизма сурфактанта, который проявляет-

ся различными респираторными заболеваниями у детей и взрослых [11]. В нашем исследовании у одного недоношенного ребенка с БЛД обнаружена замена цитозина на тимин в 14-ом экзоне гена *ABCA3* (rs148671332), приводящая к замещению аминокислоты аргинина на несхожий ей по своим свойствам триптофан, с конфликтной интерпретацией патогенности (доброкачественная *in silico*). По литературным данным такая же гетерозиготная замена выявлялась при таких заболеваниях, как легочный альвеолярный протеиноз и интерстициальное заболевание легких у взрослых пациентов и у новорожденного с респираторным дистрессом [11].

Сурфактантный белок D гена *SFTPD* явля-

Таблица 1

Редкие генетические варианты, встречающиеся единожды у пациентов с бронхолегочной дисплазией и/или ретинопатией недоношенных

Ген	rs dbSNP	Замена нуклеотида, аминокислоты	Частота (gnomAD genome)	Клиническая значимость (ClinVar)	Осложнение
Варианты в генах, ассоциированных с БЛД (группа сравнения 32 ребенка без БЛД)					
<i>ABCA3</i>	rs148671332	c.2125C > T, p.Arg709Trp	0,00162	VUS:5, LB:2	БЛД
	rs146709251	c.4420C > T, p.Arg1474Trp	0,00296	LB:4, B:4	БЛД
<i>SFTPD</i>	rs781195445	c.400A > G, p.Lys134Glu	0,00002	VUS:1	БЛД
<i>IPO13</i>	rs139063607	c.731A > T, p.Gln244Leu	0,00139	B*	БЛД
Варианты в генах, ассоциированных с РН (группа сравнения 27 детей без РН)					
<i>FZD4</i>	rs140601725	c.76C > A, p.Gln26Lys	0,00041	VUS:1, B:1	РН
	rs139401671	c.118G > C, p.Glu40Gln	0,00031	VUS:1, LB:1	РН
	rs104894223	c.766A > G, p.Ile256Val	0,00051	P:2, LB:1	РН
	rs773474310	c.1128G > T, p.Leu376Phe	0,00002	VUS:1	РН
<i>LRP5</i>	rs143433231	c.290C > T, p.Ala97Val	0,00013	LB:1	РН
	rs1127291	c.4574C > T, p.Ala1525Val	0,0096	LB:4, B:7	РН

Окончание таблицы 1

Ген	rs dbSNP	Замена нуклеотида, аминокислоты	Частота (GnomAD genome)	Клиническая значимость (ClinVar)	Осложнение
Варианты в генах, ассоциированных и с БЛД, и с РН (группа сравнения 17 детей без обоих осложнений)					
<i>SOD1</i>	rs80265967	c.272A > C, p.Asp91Ala	0,0012	P:4, LP:5, VUS:4	РН
<i>TIRAP</i>	–	c.301C > T, p.Gln101Ter	–	LP*	РН
	rs200632029	c.427C > T, p.Arg143Trp	0,00005	B*	БЛД + РН
<i>TLR6</i>	rs138792485	c.392A > G, p.Asn131Ser	0,00017	VUS*	РН
<i>AGT</i>	rs201777691	c.148A > T, p.Thr50Ser	0,00015	VUS:1, B:1	БЛД + РН
<i>AGTR1</i>	rs368951368	c.893A > G, p.Asn298Ser	0,00015	VUS:3	БЛД + РН
<i>EPAS1</i>	rs141965374	c.481G > A, p.Asp161Asn	0,00012	LB:1	БЛД + РН
	rs1169287303	c.1256A > G, p.Gln419Arg	0,0000014	VUS:1	БЛД + РН
<i>IGF1R</i>	rs45451896	c.1976G > A, p.Arg659Gln	0,00029	VUS:1, LB:1	РН
<i>IL33</i>	rs138513976	c.164A > G, p.Lys55Arg	0,00037	VUS:1	БЛД
	–	c.133A > G, p.Met45Val	–	B*	РН
<i>MMP9</i>	rs201975453	c.878T > A, p.Ile293Asn	0,00017	VUS:3	БЛД
<i>TGFBR1</i>	rs111513627	c.214A > T, p.Ile72Leu	0,00019	VUS:7, LB:5	РН
<i>ACE</i>	rs749779360	c.1324C > T, p.Arg442Cys	0,00002	B*	БЛД + РН
	rs4314	c.1681C > T, p.Arg561Trp	0,00289	LB:1, B:2	БЛД
	rs752660066	c.1931C > G, p.Thr644Ser	0,00001	B*	РН
<i>EPO</i>	rs62483572	c.208G > A, p.Asp70Asn	0,00266	LB:1	БЛД + РН
<i>GSTP1</i>	rs192307201	c.67G > T, p.Ala23Ser	0,00145	B*	РН
<i>IL18RAP</i>	rs11695455	c.407A > G, p.Asp136Gly	0,00436	B*	БЛД + РН
<i>IL6</i>	rs2069860	c.485A > T, p.Asp162Val	0,00548	B:2	БЛД + РН
<i>KDR</i>	rs139156665	c.1362T > A, p.His454Gln	0,00017	B*	БЛД
	rs34038364	c.2066C > T, p.Thr689Met	0,00291	VUS:1 LB:1 B:1	РН
<i>NFKB1</i>	–	c.283A > G, p.Lys95Glu	–	B*	РН
<i>NOS3</i>	rs3918232	c.2479G > A, p.Val827Met	0,0033	B:1	БЛД
	rs148359917	c.383G > A, p.Arg128Gln	0,00115	B:1	БЛД + РН
	rs749398455	c.3560G > A, p.Gly1187Asp	0,00115	B*	БЛД
<i>TEK</i>	rs138894008	c.1565G > T, p.Arg522Leu	0,00038	LB:1, B:1	БЛД + РН
<i>TGFBR2</i>	rs35719192	c.1119G > A, p.Met373Ile	0,00131	VUS:1, LB:19, B:6	БЛД + РН
<i>TLR4</i>	rs5030724	c.2500C > A, p.Gln834Lys	0,00039	B*	РН
<i>TLR5</i>	rs374080914	c.335C>G, p.Pro112Arg	0,00018	B*	БЛД

Примечание. В — benign (доброкачественный), LB — likely benign (вероятно доброкачественный), VUS — uncertain significance (неопределенного значения), LP — likely pathogenic (вероятно патогенный), P — pathogenic (патогенный); * — значения по предикторам патогенности базы данных VarSome

ется частью врожденного иммунного ответа, защищающего легкие от вдыхаемых микроорганизмов, органических антигенов и токсинов, модулирует активность лейкоцитов в иммунном ответе, а также вовлечен в метаболизм сурфактанта [12]. Нуклеотидный вариант p.Lys134Glu (rs781195445) гена *SFTPD*

не описан в литературе, по программам предсказания патогенности *in silico* определяется как доброкачественный.

В гене *FZD4*, ассоциированном с развитием РН, выявлены четыре несинонимичные замены, одна из которых rs104894223 (p.Ile256Val) с конфликтной интерпретацией патогенности

(известная патогенная мутация по базе данных HGMD, ID CM050620, по состоянию на 2021 г.). Миссенс-вариант p.Ile256Val находится в высоко консервативной области рецептора FZD4 и может привести к его структурному дефекту. Белок FZD4 экспрессируется в сетчатке, обеспечивает нормальное развитие ее сосудов путем активации канонического пути Wnt/ β -катенина и генов-мишеней. Отсутствие рецептора приводит к дефектному развитию сосудов с последующей неоваскуляризацией сетчатки и экссудацией. Течение ретинопатии при наличии редких нуклеотидных вариантов гена *FZD4* у недоношенных детей может усугубляться, что показано и для варианта p.Ile256Val [13]. Замена лейцина на фенилаланин в кодоне 376 белка FZD4 (rs773474310) и по ClinVar, и по предикторам патогенности имеет неопределенное клиническое значение. Клиническая значимость двух других вариантов p.Gln26Lys и p.Glu40Gln, обнаруженных в этом гене, определена как доброкачественная с использованием программ *in silico*.

В генах, ассоциированных с развитием и БЛД, и РН, обнаружено 10 однонуклеотидных замен с неопределенным клиническим значением или конфликтной интерпретацией патогенности по ClinVar.

Вариант rs80265967 гена *SOD1* с конфликтной интерпретацией патогенности выявлен у одного недоношенного новорожденного с РН. Замена аспарагиновой кислоты на аланин в положении 91-й аминокислотной последовательности приводит к образованию белка с измененной функцией. Ген *SOD1* кодирует цитоплазматическую супероксиддисмутазу, которая преобразует супероксидные радикалы в молекулярный кислород и перекись водорода. Несовершенство антиоксидантной защиты у недоношенных новорожденных и избыточный синтез свободных радикалов при оксигенотерапии способствуют развитию бронхолегочной дисплазии и ретинопатии недоношенных. Повреждение тканей за счет образования реактивных промежуточных продуктов окисления кислорода и перекисного окисления мембранных липидов вызывает вазоконстрикцию в сетчатке, которая приводит к вазооблитерации, неоваскуляризации и отслойке сетчатки [14].

В гене *TIRAP*, кодирующем адаптерный

белок, ассоциированный с толл-подобными рецепторами, выявлен гетерозиготный нонсенс-вариант (p.Gln101Ter), отсутствующий в базе данных dbSNP, патогенный по программам предсказания клинической значимости. Замена цитозина на тимин в положении 301 приводит к появлению стоп-кодона в TIR-домене белка, ответственном за взаимодействия с другими молекулами, ассоциированными с воспалительным ответом. TIRAP участвует в передаче сигнала по TLR-опосредованным сигнальным путям (TLR2, TLR4), что приводит к активации основных факторов транскрипции NF- κ B и AP-1 и, следовательно, экспрессии провоспалительных цитокинов [15].

Несинонимичная замена rs138792485 гена *TLR6*, выявленная у одного ребенка с РН, приводит к замещению аспарагина на серин в положении 131 аминокислотной последовательности. Вариант отсутствует в базе данных ClinVar, и о его клинической значимости можно судить только по программам предсказания *in silico* (умеренно патогенный). Толл-подобный рецептор 6, кодируемый геном *TLR6*, расположен на поверхности эндотелиальных клеток сетчатки и хориоидеи. Рецептор отвечает главным образом за распознавание компонентов бактериальной мембраны, инициирует сложный каскад передачи сигнала, индуцирует выработку воспалительных цитокинов и регулирует уровень костимулирующих молекул, которые играют важную роль в патогенезе ишемических заболеваний сетчатки [16].

Продукты генов *AGT* и *AGTR1* относятся к ренин-ангиотензиновой системе. RAS регулирует развитие и функционирование многих органов, активен как в здоровой, так и в пораженной легочной ткани. Существует два предполагаемых пути, с помощью которых RAS может влиять на развитие и функцию легких. Эти пути опосредуются рецепторами ангиотензина II 1-го (AGTR1) и 2-го (AGTR2) типов. Предполагается, что гипероксия может способствовать активации пути через рецептор AGTR1, вызывая усиление воспаления, гипертрофии, фиброза и эндотелиальной дисфункции, и снижать активность пути через рецептор AGTR2 с противоположным эффектом [17]. Замена треонина на серин в положении 50 аминокислотной последовательности в гене *AGT* по предикторам *in silico* определяется

как доброкачественная. Вариант р.Asn298Ser гена *AGTR1* по алгоритмам предсказания их влияния определяется как умеренно патогенный. Замена аспарагина на серин происходит в высоко консервативном мотиве NPxxY, который участвует в инициации передачи сигнала после связывания лиганда. Исследования сайт-направленного мутагенеза показали, что замена р.Asn298Ser уменьшает количество сайтов связывания и нарушает передачу сигналов рецептором [18].

Транскрипционный фактор EPAS1, кодируемый геном *EPAS1*, вовлечен в индукцию генов, экспрессия которых зависит от уровня кислорода. Белок регулирует экспрессию сосудистого эндотелиального фактора роста и, по-видимому, участвует в развитии кровеносных сосудов и канальцевой системы легких, может также играть роль в формировании эндотелия, создающего гематоэнцефалический барьер, является активатором экспрессии тирозинкиназы Tie-2 [19]. Замена глицина на аргинин в положении 419 аминокислотной последовательности гена *EPAS1* по предикторам *in silico* определяется как доброкачественная.

Рецептор инсулиноподобного фактора роста, кодируемый геном *IGF1R*, передает сигнал от фактора роста, играющего ключевую роль в нормальном развитии сетчатки и в патогенезе РН [10]. В гене рецептора определен несинонимичный редкий вариант с.1976G > A, р.Arg659Gln (rs45451896) с конфликтной интерпретацией патогенности по ClinVar и доброкачественный по программам предсказания *in silico*.

Вариант rs138513976 гена *IL33* с неопределенной клинической значимостью по базе данных ClinVar и доброкачественный по программам предсказания патогенности обнаружен у недоношенного новорожденного с БЛД. Интерлейкин 33 (IL-33), кодируемый геном *IL33*, высвобождается из поврежденных и некротизированных клеток и стимулирует иммунный ответ. IL-33 играет важную роль в иммунитете тканей слизистых оболочек, воспалении, гомеостазе, патогенезе тяжелых заболеваний дыхательных путей человека (воспаление легких, астма, аллергия). По литературным данным тяжесть течения БЛД коррелирует с уровнем IL-33 в плазме [20].

Матриксная металлопротеиназа 9, кодиру-

емая геном *MMP9*, участвует как в физиологических, так и в патологических процессах: разрушает белки внеклеточного матрикса, индуцирует образование сосудов, усиливает миграцию клеток, активирует или инактивирует провоспалительные цитокины, модифицирует образование новых сосудов, усиливает миграцию воспалительных клеток и способствует ремоделированию тканей в легких [21]. Редкий вариант с.878T > A (rs201975453) гена *MMP9* обнаружен у одного недоношенного новорожденного с БЛД и заключается в замене неполярной аминокислоты изолейцин на полярный аспарагин в позиции 293 аминокислотной последовательности. Клиническая значимость замены по ClinVar не определена, по алгоритмам прогнозирования влияния является доброкачественной.

Нуклеотидная замена rs111513627 гена *TGFBR1* с конфликтной интерпретацией патогенности как по базе данных ClinVar, так и по программам предсказания патогенности выявлена у младенца с РН. Кодируемый этим геном рецептор 1 трансформирующего фактора роста участвует в передаче сигнала по TGF- β сигнальному пути, играющему важную роль в ангиогенезе, пролиферации клеток эндотелия, ремоделировании внеклеточного матрикса, нарушении гематоретинального барьера [22].

Исходя из проведенного анализа, среди 42 недоношенных новорожденных с одним или двумя осложнениями, выявлены семь редких вариантов, которые могут вносить существенный вклад в исследуемый фенотип (rs138792485 гена *TLR6*, не встречаемый ранее вариант р.Gln101Ter гена *TIRAP*, rs104894223 и rs773474310 гена *FZD4*, rs368951368 гена *AGTR1*, rs111513627 гена *TGFBR1*, rs80265967 гена *SOD1*).

Определение риска развития БЛД и РН у недоношенных новорожденных по вариантам нуклеотидной последовательности с MAF $\geq 0,01$

Учитывая низкую статистическую мощность анализа вследствие ограниченных выборок пациентов, поиск ассоциации кандидатных вариантов нуклеотидной последовательности проводился для БЛД по 10 генам (*ABCA3*, *EGF*, *EGFR*, *IPO13*, *MBL2*, *SFTPA1*, *SFTPA2*, *SFTPB*, *SFTPC*, *SFTPD*), для РН по 5 генам (*FZD4*, *LRP5*, *PRSS23*, *TSPAN12*, *ZNF408*), значимость

которых в развитии осложнений ранее была установлена в работах других исследователей [2–6]. К полиморфным вариантам с $MAF > 0,1$ был применен уровень значимости $p = 0,05$; вариантам с частотой альтернативного аллеля $0,01 \leq MAF \leq 0,1$ — $p = 0,001$. Схожий подход применялся при исследовании заболеваний мультифакторной этиологии — сахарного диабета 2-го типа и ожирения — на небольшой когорте пациентов (49 и 21 соответственно) с использованием WES [23, 24].

Попарное сравнение частот распределения генотипов 14 выявленных вариантов нуклеотидной последовательности генов, ассоциированных с РН, между группой младенцев

с ретинопатией (32 ребенка) и без нее (27 детей) не показало статистически достоверных различий.

Группа сравнения для пациентов с БЛД (27 младенцев) была представлена недоношенными новорожденными без исследуемого осложнения (32 ребенка). В генах, ассоциированных с развитием БЛД, выявлен 51 полиморфный вариант с $MAF \geq 0,01$. В таблице 2 представлены замены, в которых достигнуты статистически значимые различия по распределению частот их генотипов в сравниваемых группах.

Представленные однонуклеотидные замены являются синонимичными и не оказывают влияния на структуру кодируемых ими белков.

Таблица 2

Распределение частот генотипов полиморфных локусов генов, ассоциированных с развитием БЛД

Ген rs замены	Генотип	Пациенты с БЛД	Пациенты без БЛД	p	OR(95% CI)
<i>ABCA3</i> rs323043	GG	88,9	62,5	0,044	4,8(1,19–19,4)
	GC	7,4	37,5	0,016	0,13(0,03–0,67)
	CC	3,7	0	0,93	3,68(0,14–94,2)
<i>EGFR</i> rs2227984	TT	18,5	50	0,025	0,23(0,07–0,75)
	TA	66,7	37,5	0,049	3,33(1,14–9,76)
	AA	14,8	12,5	0,90	1,22(0,27–5,41)
<i>SFTPA2</i> rs1965707	GG	40,7	75	0,009	0,23(0,08–0,70)
	GA	55,6	12,5	0,001	8,75(2,40–31,9)
	AA	3,7	12,5	0,46	0,27(0,03–2,57)

Заключение

С использованием полноэкзомного секвенирования у 59 недоношенных новорожденных проведен анализ спектра нуклеотидных вариантов 88 генов, ассоциированных с развитием БЛД и РН. Выявлено 376 нуклеотидных вариантов, из них 126 с $MAF < 0,01$.

Редкие варианты с патогенным эффектом или неопределенной клинической значимостью выявлены у недоношенных младенцев с РН (rs138792485 гена *TLR6*, не встречаемый ранее вариант p.Gln101Ter гена *TIRAP*, rs104894223 и rs773474310 гена *FZD4*, rs368951368 гена *AGTR1*, rs111513627 гена *TGFBR1*, rs80265967 гена *SOD1*). Эти варианты с большей долей вероятности могут вносить вклад в проявление осложнений в сочетании с другими генетическими факторами

и факторами окружающей среды.

Несмотря на то, что исследование выполнено на сравнительно небольшом числе образцов (вследствие его высокой стоимости), ассоциативный анализ вариантов нуклеотидной последовательности с $MAF \geq 0,01$ выявил статистически значимые различия в трех из них (rs323043 *ABCA3*, rs2227984 *EGFR*, rs1965707 *SFTPA2*) между младенцами с БЛД и недоношенными новорожденными без БЛД. Полученные результаты являются предварительными.

Необходимо продолжить исследования на большей выборке пациентов для проверки воспроизводимости обнаруженных клинико-генетических ассоциаций и поиска новых потенциальных кандидатных генов и вариантов, ассоциированных с осложнениями, а также подтвердить выявленные генетические замены

с патогенным эффектом или неопределенной клинической значимостью методом секвенирования по Сэнгеру.

Авторы выражают благодарность сотрудникам кафедры неонатологии ИПКиПКЗ УО БГМУ — Шишко Г. А., Артюшевой М. В., Сухаревой А. П., осуществлявших в 2018–2022 гг. сбор образцов биологического материала и анкетных данных пациентов.

Список использованных источников

1. Ancestry and genetic associations with bronchopulmonary dysplasia in preterm infants / D. G. Torgerson [et al.] // *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* – 2018. – Vol. 315. – P. 858–869.
2. Exome sequencing and pathway analysis for identification of genetic variability relevant for bronchopulmonary dysplasia (BPD) in preterm newborns: A pilot study / P. Carrera [et al.] // *Clin. Chim. Acta.* – 2015. – Vol. 451. – P. 39–45.
3. Retinopathy of prematurity: a review of risk factors and their clinical significance / S. J. Kim [et al.] // *Surv. Ophthalmol.* – 2018. – Vol. 63. – P. 618–637.
4. Exome sequencing identifies gene variants and networks associated with extreme respiratory outcomes following preterm birth [Electronic resource] / A. Hamvas [et al.] // *Genet.* – 2018. – A. 94. – Mode of access: <https://bmccgenomdata.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12863-018-0679-7>. – Date of access: 28.01.2024.
5. A pathogenic relationship of bronchopulmonary dysplasia and retinopathy of prematurity? A review of angiogenic mediators in both diseases [Electronic resource] / A. Stark [et al.] // *Front. Pediatr.* – 2018. – Vol. 6. – Mode of access: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fped.2018.00125/full>. – Date of access: 28.01.2024.
6. Genetic contributions to the development of complications in preterm newborns [Electronic resource] / C. Poggi [et al.] // *PLoS ONE.* – 2015. – Vol. 10. – A. e0131741. – Mode of access: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0131741>. – Date of access: 28.01.2024.
7. Hypoxia-inducible pathway polymorphisms and their role in the complications of prematurity [Electronic resource] / E. Strauss [et al.] // *Genes.* – 2023. – Vol. 14. – Mode of access: <https://www.mdpi.com/2073-4425/14/5/975>. – Date of access: 28.01.2024.
8. The role of genetic factors in the pathogenesis of neonatal intraventricular hemorrhage [Electronic resource] / D. Szpecht [et al.] // *Folia Neuropathol.* – 2015. – Vol. 1. – P. 1–7. – Mode of access: <https://www.termedia.pl/Review-paper-The-role-of-genetic-factors-in-the-pathogenesis-of-neonatal-intraventricular-hemorrhage,20,24859,1,1.html>. – Date of access: 16.02.2024.
9. Alvira, C. M. Aberrant pulmonary vascular growth and remodeling in bronchopulmonary dysplasia [Electronic resource] / C. M. Alvira // *Front. Med.* – 2016. – Vol. 3, A. 21. – P. 1–21. – Mode of access: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmed.2016.00021/full>. – Date of access: 28.01.2024.
10. The genetics of retinopathy of prematurity: a model for neovascular retinal disease / R. Swan [et al.] // *Ophthalm. Retina.* – 2018. – Vol. 2. – P. 949–962.
11. Lung disease caused by ABCA3 mutations / C. Kröner [et al.] // *Thorax.* – 2017. – Vol. 72. – P. 213–220.
12. GeneCards®: The human gene database [Electronic resource]. – Mode of access: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=SFTPD>. – Date of access: 28.01.2024.
13. Kondo, H. Complex genetics of familial exudative vitreoretinopathy and related pediatric retinal detachments / H. Kondo // *Taiwan. J. Ophthalmol.* – 2015. – Vol. 5. – P. 56–62.
14. Free radical status in retinopathy of prematurity / U. Garg [et al.] // *Indian J. Clin. Biochem.* – 2011. – Vol. 27. – P. 196–199.
15. TIRAP in the mechanism of inflammation [Electronic resource] / S. Rajpoot [et al.] // *Front. Immunol.* – 2021. – Vol. 12. – A. 697588. – Mode of access: <https://www.frontiersin.org/journals/immunology/articles/10.3389/fimmu.2021.697588/full>. – Date of access: 28.01.2024.
16. Titi-Lartey, O. Toll-like receptor signalling pathways and the pathogenesis of retinal diseases [Electronic resource] / O. Titi-Lartey, I. Mohammed, W. M. Amoaku // *Front. Ophthalmol.* – 2022. – Vol. 2. – A. 850394. – Mode of access: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fopht.2022.850394/full>. – Date of access: 28.01.2024.

17. Hyperoxia-induced airflow restriction and renin-angiotensin system expression in a bronchopulmonary dysplasia mouse model [Electronic resource] / J. Dowell [et al.] // *Physiol. Reports*. – 2024. – Vol. 12, A. e15895. – Mode of access: <https://physoc.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.14814/phy2.15895>. – Date of access: 28.01.2024.
18. Variations of the angiotensin II type 1 receptor gene are associated with extreme human longevity / A. Benigni [et al.] // *AGE*. – 2012. – Vol. 35, № 3. – P. 993–1 005.
19. GeneCards®: The human gene database [Electronic resource]. – Mode of access: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=EPAS1&keywords=EPAS1>. – Date of access: 14.02.2024.
20. Cakir, U. A novel diagnostic marker for the severity of bronchopulmonary dysplasia in very low birth weight infants: interleukin-33 [Electronic resource] / U. Cakir, C. Tayman, C. Yucel // *Pediatr. Allerg. Immunol. Pulm.* – 2019. – Vol. 32. – P. 12–17. – Mode of access: <https://www.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/ped.2019.0994>. – Date of access: 28.01.2024.
21. Matrix metalloproteinase-9 deficiency worsens lung injury in a model of bronchopulmonary dysplasia / H. Lukkarinen [et al.] // *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* – 2009. – Vol. 41, № 1. – P. 59–68.
22. Complex roles of TGF- β signaling pathways in lung development and bronchopulmonary dysplasia [Electronic resource] / R. J. Calthorpe [et al.] // *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* – 2023. – Vol. 324. – P. 285–296. – Mode of access: <https://journals.physiology.org/doi/full/10.1152/ajplung.00106.2021>. – Date of access: 28.01.2024.
23. Identification of novel candidate markers of type 2 diabetes and obesity in Russia by exome sequencing with a limited sample size [Electronic resource] / Y. A. Barbitoff [et al.] // *Genes*. – 2018. – Vol. 9, A. 415. – Mode of access: <https://www.mdpi.com/2073-4425/9/8/415>. – Date of access: 23.02.2024.
24. Глотов, О. С. Секвенирование экзома человека и перспективы предиктивной медицины : дис. ... д-ра биол. наук : 01.05.07 / О. С. Глотов. – Санкт-Петербург, 2023. – 242 л.

V. M. Malyshava, A. P. Mikhalenka, A. Ch. Mazur, A. V. Kilchevsky

VARIABILITY OF GENES ASSOCIATED WITH BRONCHOPULMONARY DYSPLASIA AND RETINOPATHY IN PREMATURE NEWBORNS

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

Bronchopulmonary dysplasia (BPD) and retinopathy of prematurity (ROP) are the most common pathological conditions of premature newborns. The diseases have multifactorial etiology with a significant genetic component. A spectrum of 376 nucleotide variants (126 with MAF <0,01) in 88 genes associated with BPD and ROP was determined by exome sequencing in 59 premature newborns with a gestational age of 28–36 weeks. Rare pathogenic or uncertain significance variants were identified in the group of infants with ROP (rs138792485 of the *TLR6* gene, p.Gln101Ter of the *TIRAP* gene, rs104894223 and rs773474310 of the *FZD4* gene, rs368951368 of the *AGTRI* gene, rs111513627 of the *TGFBR1* gene, rs80265967 of the *SOD1* gene). Using the search method for variations associated with multifactorial diseases in the cohorts of a limited size, preliminary statistically significant differences were achieved in the distribution of the genotype frequencies of rs323043 *ABCA3*, rs2227984 *EGFR*, rs1965707 *SFTPA2* variants among the infants with BPD and premature newborns without BPD.

Keywords: nucleotide sequence variant, premature newborns, bronchopulmonary dysplasia, retinopathy of prematurity, whole-exome sequencing.

Дата поступления в редакцию: 12 февраля 2024 г.

А. В. Горбач¹, Е. П. Михаленко¹, О. Ч. Мазур¹, Л. И. Кастюкевич², О. Н. Романова²,
К. Ю. Мараховский³, О. Н. Назаренко², А. В. Кильчевский¹

РАЗНООБРАЗИЕ ПАТОГЕННЫХ ТАКСОНОВ МИКРОБИОМА У ДЕТЕЙ С ВОСПАЛИТЕЛЬНЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ КИШЕЧНИКА

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

e-mail: a.gorbach@igc.by

²Учреждение образования

«Белорусский государственный медицинский университет»
Республика Беларусь, 220083, г. Минск, ул. Дзержинского, 83

³Государственное учреждение

«Республиканский научно-практический центр детской хирургии»
Республика Беларусь, 220013, г. Минск, пр-т Независимости, 64А

В статье представлены результаты исследования таксономического состава потенциально патогенных и условно-патогенных микроорганизмов кишечной микробиоты у 43 пациентов детского возраста (от 0 до 18 лет) с воспалительными заболеваниями кишечника. С помощью метатаксономического анализа методом секвенирования фрагментов генов 16S рРНК был установлен таксономический состав микроорганизмов. Для количественной оценки α - и β -разнообразия потенциально патогенных и условно-патогенных таксонов между тремя группами пациентов были рассчитаны индексы Шеннона и Пиэлоу, а также проведена ординация образцов. По результатам статистического анализа достоверные различия между группами отсутствуют. Полученные количественные характеристики могут помочь в разработке новых подходов в диагностике и лечении воспалительных заболеваний кишечника.

Ключевые слова: воспалительные заболевания кишечника, микробиом, таксономический состав, секвенирование генов 16S рРНК, дисбиоз.

Введение

Воспалительные заболевания кишечника (ВЗК) характеризуются тяжелым воспалением тонкой и / или толстой кишки, приводящим к рецидивирующей диарее и боли в животе. Болезнь Крона (БК) и язвенный колит (ЯК) являются двумя основными клинико-патологическими подтипами ВЗК. Несмотря на то, что они являются хроническими и рецидивирующими воспалительными заболеваниями кишечника, их можно дифференцировать по локализации воспаления в желудочно-кишечном тракте и по характеру гистологических изменений в кишечной стенке. Анатомически БК может затронуть весь желудочно-кишечный тракт, хотя чаще отмечается повреждение подвздошной и толстой кишки. ЯК ограничивается прямой кишкой, толстой кишкой и слепой

кишкой. Микроскопически при БК повреждение является трансмуральным и часто прерывистым, в то время как ЯК непрерывно влияет только на слизистую оболочку кишечника [1].

Воспалительные заболевания кишечника рассматриваются как мультисистемные заболевания, возникающие под влиянием взаимодействия как генетических, так и факторов окружающей среды, таких как стресс, режим сна, использование антибиотиков, гигиенические условия, диета и курение. К генетическим предрасполагающим факторам относят нарушения генов, вовлеченных в регуляцию воспалительного ответа [2]. Несмотря на глобальный рост заболеваемости, точная этиология ВЗК остается неустановленной. Гипотеза мультифакториального патогенеза ВЗК на сегодня является наиболее обоснованной [3, 4].

Именно синергетическое действие разных факторов нарушает баланс между воспалительным ответом и иммунной толерантностью к комменсальной микробиоте в слизистой оболочке толстой кишки. Это приводит к нарушению гомеостаза и развитию ВЗК [5]. Клинические и экспериментальные данные указывают на ключевую роль дисбиоза в патогенезе ВЗК неясной этиологии [10].

Микробиом кишечника представляет собой уникальное сообщество микроорганизмов с высоким таксономическим разнообразием, локализующихся преимущественно в толстом кишечнике. Бактерии составляют более 90% этой микробной популяции (или как вариант микробиомного сообщества), однако в нем также присутствуют археи, грибы и простейшие [6]. По последним данным, в составе микробиома толстой кишки человека идентифицировано более 1 000 бактериальных видов [5].

Микробиота стимулирует дифференцировку и секрецию муцина клетками Панета. Муцин образует защитный гидрофильный слой на поверхности слизистой, предотвращающий прикрепление патогенов и обеспечивающий смачиваемость эпителия [8]. Бактерии кишечника стимулируют продукцию антимикробных пептидов (дефензинов, REG3A) со стороны эпителиальных клеток [9].

Классификация микроорганизмов человеческой микробиоты на «полезные» и «патогенные» представляет собой упрощенный подход. Граница между комменсалами и условно-патогенными микроорганизмами зачастую носит условный характер. Многие микробы способны выполнять как полезные, так и потенциально патогенные функции в зависимости от внешней среды и состояния иммунитета хозяина. Взаимоотношения между микроорганизмами человеческой микробиоты и иммунной системой хозяина носят динамический характер и зависят от множества факторов. Многие представители комменсальной микробиоты, например, *Staphylococcus* spp. и определенные виды рода *Clostridium*, при нормальном функционировании иммунитета остаются комменсалами и не оказывают патогенного действия [10].

Однако при иммунодефиците или дисбиозе эти же микроорганизмы способны обрести патогенные свойства вследствие нарушения де-

терминант взаимодействия с клетками хозяина [11]. Более того, отдельные штаммы одних и тех же видов могут различаться по уровню вирулентности [12]. Несбалансированность в составе потенциально патогенных и условно-патогенных микроорганизмов в микробиоценозе может оказывать влияние на эффективность проводимой антимикробной терапии у пациентов. Изменения в относительной представленности токсигенных и резистентных таксонов способны снижать чувствительность микробной популяции к антибактериальным препаратам и затруднять достижение терапевтического эффекта [13].

Поэтому целью исследования было сравнить потенциально патогенный и условно-патогенный бактериальный состав кишечного микробиома у детей с ВЗК с различной клинической картиной.

Материалы и методы

Для настоящего исследования была собрана выборка из 43 пациентов детского возраста от 0 до 18 лет (медиана 8,1 года) с ВЗК. У пациентов были диагностированы заболевания желудочно-кишечного тракта различной степени тяжести, в результате чего они были госпитализированы в учреждение здравоохранения «городская детская инфекционная клиническая больница», государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр детской хирургии», учреждение здравоохранения «4-я городская детская клиническая больница».

Все 43 пациента были разделены на три группы. Первая группа включала в себя 21 пациента, у которых был верифицирован диагноз ВЗК на основании клинических и гистологических данных. Вторая группа — 10 детей с клиническими и гистологическими проявлениями недифференцированного колита. Третья группа — 12 пациентов, с клиническими гастроэнтерологическими симптомами и отсутствием признаков патологических изменений при гистологическом исследовании образца биопсийного материала.

На момент формирования экспериментальной группы пациенты, в нее вошедшие, не получали антибактериальных препаратов. Отбор образцов ткани толстой кишки путем биопсии проводился до начала лечения.

Для постановки диагноза и разделения пациентов на три группы были применены стандартизированные методы исследования, включая сбор анамнеза, клинические обследования, лабораторные анализы (ОАК, ОАМ, БАК) и инструментальные методы исследования.

Сбор биологического материала (биопсийных образцов слизистой оболочки восходящего отдела толстой кишки) проводился с соблюдением принципов добровольности и конфиденциальности в соответствии с информированным согласием законного представителя пациента.

Для получения биопсийного материала толстой кишки использовался эндоскопический метод. Биологический материал после забора помещался в стерильный 0,9%-й NaCl, что позволяет сохранить целостность биообразца. Согласно разработанному унифицированному протоколу, собранный биологический материал замораживается через строго определенный интервал времени (30 мин). Далее биоматериал транспортируется в лабораторию для последующего выделения ДНК, соблюдая холодовую цепь.

Выделение ДНК из биопсийного материала толстой кишки для последующего метатаксономического анализа микробиома было проведено с использованием набора ReliaPrep™ FFPE gDNA Miniprep System (Promega Corporation, США).

Для анализа микробиома кишечника были использованы специфические праймеры, предназначенные для амплификации V3–V4 региона гена 16S рРНК. Данный ген 16S рРНК включает в себя консервативные и переменные участки. Одним из фрагментов гена, используемых для определения таксономической принадлежности бактерий, является фрагмент нуклеотидной последовательности, включающий V3–V4 переменный регион [14, 15].

После амплификации регионов V3–V4 проводилась пробоподготовка согласно протоколу Illumina для 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation (США) — метагеномного секвенирования с модификациями разработанными в лаборатории Государственного научного учреждения «Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси», что гарантировало стандартизированное выполнение этапов очистки, индексирования об-

разцов и подготовки их к загрузке в прибор MiSeq (Illumina). На этапе амплификации целевых регионов использовалась стандартная ПЦР-смесь для рутинного анализа, содержащая *Taq*-полимеразу. На этапе присоединения индексов ПЦР-микса с 5'-3' полимеразной и 3'-5' экзонуклеазной (корректирующая) активностью и отсутствующей 5'-3' экзонуклеазной активностью был использован аналог — 2x HiFi HotStart ReadyMix (NEBNext Q5 Hot Start HiFi PCR Master Mix, New England Biolabs).

Полученные прочтения нуклеотидных последовательностей в формате fastq проходили обработку согласно биоинформатическому конвейеру для анализа микробиомных данных, разработанному сектором биоинформатики Института генетики и цитологии НАН Беларуси.

Оценку качества библиотек ампликонов проводили с помощью программы FastQC V.0.11.9, праймеры и ложные последовательности были удалены с помощью программы Cutadapt v3.1 (2020 г.). Метагеномные данные обработаны с использованием пакета DADA2 для языка программирования R. Фрагменты гена 16S рРНК выравнены и таксономически аннотированы с использованием базы данных Silva SSU NR99 (версия 138) с доверительным порогом 80% [15] и кластеризованы в операционные таксономические единицы (OTU) на расстоянии 0,03 с помощью mothur v.1.45.0 [16]. При неопределенной систематике микроорганизма осуществляли дополнительный поиск данных с помощью BLAST-анализа на основе базы RefSeq nr [22].

Результаты и обсуждение

Молекулярно-генетические методы исследования микробиоты человека, такие как анализ гена 16S рРНК, позволяют детально проанализировать состав сообществ микроорганизмов, населяющих различные экологические ниши организма человека.

Ген 16S рРНК включает в себя консервативные и переменные участки. Одним из фрагментов гена, используемых для определения таксономической принадлежности бактерий, является фрагмент нуклеотидной последовательности, включающий V3–V4 переменный регион, что позволяет идентифицировать и классифицировать их на основе последо-

вательностей этого региона. Точность и разрешение этого метода анализа микробиома в значительной степени зависят от выбранного региона [21].

Для проведения анализа был сформирован перечень потенциально патогенных и условно-патогенных микроорганизмов, подлежащих оценке в каждой из изученных групп. В таблице 1 представлен перечень таксонов, который сформирован согласно NCBI [23]. Затем была проведена фильтрация полученных

данных по сформированному перечню микроорганизмов. Далее проводилось сравнение микробиоценозов между группами путем количественного и качественного сопоставления данных с целью выявления различий и установления возможных взаимосвязей.

В таблице 2 указаны результаты квантификации потенциально патогенных и условно-патогенных таксонов, представленные в виде процентных значений их доли от общего числа прочтений.

Таблица 1

Перечень патогенных таксонов

1	<i>Acinetobacter baumannii</i>	30	<i>Enterobacter chuandaensis</i>	58	<i>Kosakonia oryzendophytica</i>
2	<i>Aerococcus viridans</i>	31	<i>Enterobacter cloaca</i>	59	<i>Kosakonia oryziphila</i>
3	<i>Aeromonas hydrophila</i>	32	<i>Enterobacter cloacae</i>	60	<i>Legionella pneumophila</i>
4	<i>Aeromonas salmonicida</i>	33	<i>Enterobacter hormaechei</i>	61	<i>Listeria innocua</i>
5	<i>Aeromonas sobria</i>	34	<i>Enterobacter kobei</i>	62	<i>Listeria monocytogenes</i>
6	<i>Aeromonas veronii</i>	35	<i>Enterobacter ludwigii</i>	63	<i>Mannheimia haemolytica</i>
7	<i>Bacillus cereus</i>	36	<i>Enterobacter mori</i>	64	<i>Morganella morganii</i>
8	<i>Bacteroides burgdorferi</i>	37	<i>Enterobacter oligotrophicus</i>	65	<i>Pasteurella multocida</i>
9	<i>Bacteroides fragilis</i>	38	<i>Enterobacter roggkampii</i>	66	<i>Photobacterium damsela</i>
10	<i>Bacteroides vulgatus</i>	39	<i>Enterobacter sichuanensis</i>	67	<i>Phytobacter massiliensis</i>
11	<i>Burkholderia cepacia complex</i>	40	<i>Enterobacter soli</i>	68	<i>Pluralibacter gergoviae</i>
12	<i>Campylobacter concisus</i>	41	<i>Enterococcus faecalis</i>	69	<i>Proteus mirabilis</i>
13	<i>Campylobacter jejuni</i>	42	<i>Enterococcus faecium</i>	70	<i>Providencia alcalifaciens</i>
14	<i>Candida auris</i>	43	<i>Escherichia albertii</i>	71	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
15	<i>Citrobacter freundii</i>	44	<i>Escherichia coli</i>	72	<i>Ruminococcus gnavus</i>
16	<i>Citrobacter rodentium</i>	45	<i>Mycobacterium avium paratuberculosis</i>	73	<i>Salmonella enterica</i>
17	<i>Clostridioides difficile</i>	46	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	74	<i>Serratia marcescens</i>
18	<i>Clostridium botulinum</i>	47	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	75	<i>Shewanella algae</i>
19	<i>Clostridium perfringens</i>	48	<i>Neisseria lactamica</i>	76	<i>Staphylococcus aureus</i>
20	<i>Corynebacterium striatum</i>	49	<i>Neisseria meningitidis</i>	77	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>
21	<i>Cronobacter</i>	50	<i>Neisseria polysaccharea</i>	78	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
22	<i>Edwardsiella ictaluri</i>	51	<i>Flavobacterium sychrophilum</i>	79	<i>Streptococcus agalactiae</i>
23	<i>Edwardsiella piscicida</i>	52	<i>Fusobacterium nucleatum</i>	80	<i>Streptococcus equi</i>
24	<i>Edwardsiella tarda</i>	53	<i>Fusobacterium varium</i>	81	<i>Streptococcus fecalis</i>
25	<i>Elizabethkingia anophelis</i>	54	<i>Helicobacter</i>	82	<i>Streptococcus iniae</i>
26	<i>Enterobacter asburiae</i>	55	<i>Klebsiella oxytoca</i>	83	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
27	<i>Enterobacter bugandensis</i>	56	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	84	<i>Streptococcus pyogenes</i>
28	<i>Enterobacter cancerogenus</i>	57	<i>Kluyvera intermedia</i>	85	<i>Streptococcus suis</i>
29	<i>Enterobacter chengduensis</i>				

Среднее количество прочтений на образец после фильтрации составил 130 349. Хотя различия в среднем количестве прочтений между группами не достигали статистической значимости ($p = 0,07$), наибольший про-

цент прочтений потенциально патогенных и условно-патогенных микроорганизмов был выявлен во второй группе ($3,5 \pm 1,1\%$), наименьший — в третьей группе ($1,3 \pm 0,1\%$). В первой группе этот показатель был проме-

Таблица 2

Квантификации потенциально патогенных и условно-патогенных таксонов в группе

Шифр образца	Количество прочтений потенциально патогенных и условно-патогенных таксонов	Общее количество прочтений после фильтрации	Процентное содержание
1 группа			
32 LK	5 141	175 954	3
60/2 LK	1 357	77 272	2
22 LK	1 528	65 516	2
15 LK-2	3 490	73 537	5
15 LK-3	8 993	164 550	5
15 LK-1	2 038	60 317	3
68 LK	5 394	397 821	1
63 LK	1 204	77 272	2
8 LK	732	88 846	1
62 LK	5 448	157 314	7
23 LK	2 093	88 846	2
67 LK	4 215	144 309	3
44 LK	9 825	147 765	7
43 LK	2 748	122 247	2
55 LK-2	11 965	141 981	8
11 LK-2	2 082	174 147	1
52 LK-2	6 447	165 676	4
28 LK-1	589	244 256	0,8
26 LK	1 862	163 882	1
65 LK	2 425	124 445	2
69 LK	5 394	307 821	1,7
2 группа			
51 LK	5 551	151 553	4
4 LK	1 218	70 680	2
61 LK	10 471	161 372	6
14 LK	470	62 757	1
33 LK	1 399	22 677*	6
29 LK	13 663	114 752	12
31 LK-1	1 471	205 224	1
66 LK	1 041	160 850	1
70 LK	978	67 235	1
34 LK	323	168 851	0,8

Окончание таблицы 2

Шифр образца	Количество прочтений потенциально патогенных и условно-патогенных таксонов	Общее количество прочтений после фильтрации	Процентное содержание
3 группа			
42 LK	1 955	137 766	1
7 LK	527	77 071	1
18 LK-2	1 741	109 702	2
25 LK	2 148	146 091	1
64 LK	1 584	164 212	1
59 LK-2	1 315	84 815	2
24 LK	2 955	156 080	2
6 LK	1 584	164 212	1
19 LK	599	84 475	1
56 LK-2	1 144	167 013	1
45 LK	3 475	155 880	2
54 LK	442	68 876	1

Примечание. * — получены предварительные данные, требующие дальнейшей верификации и уточнения

жуточным и составил $3 \pm 0,4\%$.

Для определения альфа-разнообразия потенциально патогенных и потенциально условно-патогенных микроорганизмов в исследуемых образцах использовали индекс Шеннона и индекс Пиэлоу, которые являются одними из наиболее распространенных индексов разнообразия в микробиологических исследованиях. Индекс Шеннона позволяет оценить биоразнообразие внутри конкретного образца и выразить его в численной форме. Его расчет основан на количестве и относительной распространенности разных таксонов в образце. Индекс Шеннона учитывает как богатство видов (количество различных таксонов), так и их равномерность (относительную распространенность каждого таксона). Большое значение индекса Шеннона указывает на высокое разнообразие микроорганизмов в образце, в то время как низкое значение может свидетельствовать о доминировании некоторых определенных таксонов.

Индекс Пиэлоу — это статистический показатель, используемый для оценки равномерности распределения таксонов в сообществе. Он показывает, насколько однородно относительное обилие таксонов распределено внутри сообщества. Индекс позволяет количественно оценить степень равномерности распределе-

ния таксонов в микробиоте. Значение индекса варьируется от 0 до 1. Значение «0» указывает на полное доминирование одного таксона, распределение крайне неравномерное. Значение «1» означает идеально равномерное распределение, когда обилие каждого таксона вносит равный вклад в общую численность сообщества. Чем ближе значение индекса к 1, тем более равномерным и устойчивым является сообщество с точки зрения равного представительства разных таксонов.

В исследовании индексы Шеннона и Пиэлоу были рассчитаны только для перечня видов потенциально патогенных и условно-патогенных, который был определен для анализа в рамках данного исследования с целью оценки разнообразия именно потенциально патогенных и условно-патогенных микроорганизмов (табл. 3). При этом индексы не рассчитывались для общего списка всех обнаруженных видов бактерий, поскольку не ставилась цель охарактеризовать биоразнообразие микробиоценоза в целом.

Как видно из приведенных данных (рис. 1), наибольшее значение медианы индекса Шеннона наблюдалось в группе 1, наименьшее — в группе 2.

Значения индекса Шеннона варьировали в следующих пределах:

Таблица 3

Индексы Шеннона и Пиэлоу для трех групп

Индекс Шеннона			Индекс Пиэлоу		
1 группа	2 группа	3 группа	1 группа	2 группа	3 группа
1,951	1,679	1,28	0,5534	0,4937	0,4347
1,41	0,4783	1,201	0,4632	0,1655	0,4239
1,531	0,8338	1,328	0,5028	0,2428	0,4791
1,48	1,076	1,716	0,4271	0,3481	0,5827
1,493	1,993	1,191	0,4233	0,6046	0,4203
1,47	1,091	1,446	0,4321	0,3177	0,491
1,213	1,853	1,987	0,35	0,5395	0,6747
1,745	1,57	1,191	0,5295	0,5242	0,4203
1,755	1,806	1,132	0,5387	0,5479	0,4084
1,375		1,543	0,3869		0,5339
1,691		1,585	0,5321		0,5383
1,067			0,3079		
1,521			0,4349		
1,867			0,5732		
1,051			0,3006		
2,04			0,5834		
1,593			0,4555		
1,826			0,5746		
1,491			0,469		
1,419			0,4057		

Группа 1: медиана 1,526; минимум 1,051; максимум 2,04.

Группа 2: медиана 1,091; минимум 0,4783; максимум 1,993.

Группа 3: медиана 1,328; минимум 1,132; максимум 1,987.

Как видно из представленных данных (рис. 2), медианные значения индекса Пиэлоу были сопоставимы между группами и варьи-

ровали в диапазоне от 0,3481 до 0,4747. Минимальные значения также не имели существенных различий между группами.

Значения индекса Пиэлоу варьировали в следующих пределах:

Группа 1: медиана 0,4555; минимум 0,3006; максимум 0,5834.

Группа 2: медиана 0,3481; минимум 0,1655; максимум 0,6046.

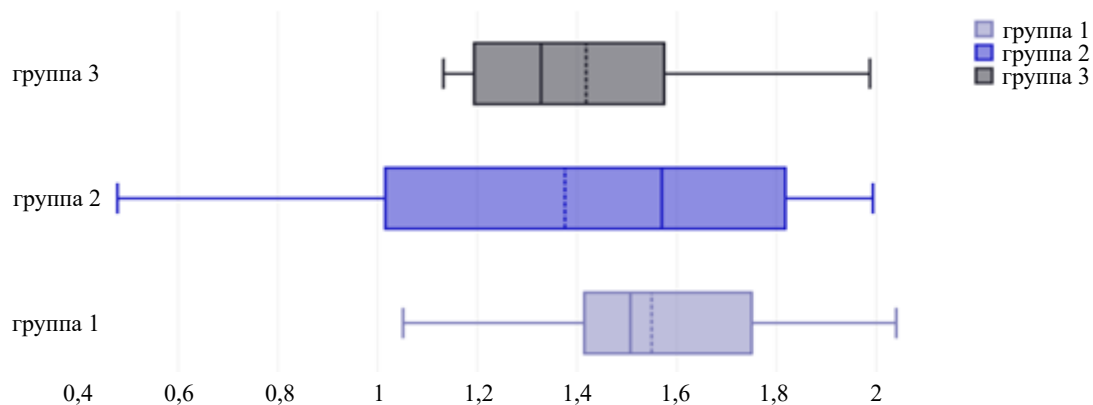


Рис. 1. Диаграмма распределения показателей индекса Шеннона для трех групп

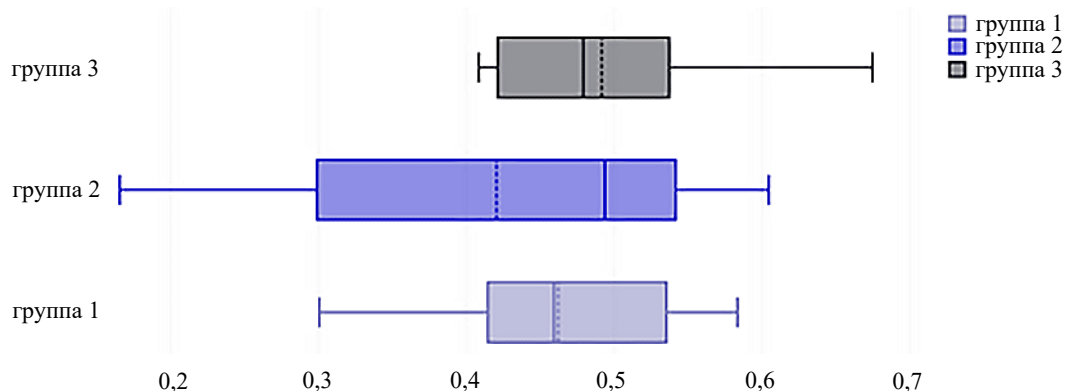


Рис. 2. Диаграмма распределения показателей индекса Пиэлоу для трех групп

Группа 3: медиана 0,4747; минимум 0,4084; максимум 0,6747.

Для сравнения медиан индексов Шеннона и Пиэлоу между тремя группами пациентов был использован тест Крускала-Уоллиса. По результатам анализа индекса Шеннона значения статистики H и скорректированной H_s меньше критического, p -значение больше уровня значимости 0,05. Следовательно, между группами нет статистически значимых различий. Для индекса Пиэлоу также нет значимых различий между группами по медианам ($p = 0,6398$).

Таким образом, применение теста Крускала-Уоллиса не выявило значимых отличий в медианах индексов между исследуемыми группами. На основании полученных результатов можно сделать вывод об отсутствии достоверных различий в α -разнообразии потенциально патогенных и условно-патогенных микроорганизмов, оцениваемых с помощью индексов Шеннона и Пиэлоу.

Оценка β -разнообразия представлена на рисунках 3–5. На диаграмме β -разнообразия отражает степень расхождения в составе микробных сообществ между биологическими образцами. Путем оценки этого параметра был проведен сравнительный анализ микробиоты участников исследования.

На диаграммах четко прослеживается, что образцы первой группы демонстрируют наименьшее β -разнообразие. Все точки плотно сгруппированы в одну область диаграммы. Это означает, что состав потенциально патогенных и условно патогенных таксонов был высоко унифицирован у пациентов этой группы. Это свидетельствует об их максимально схо-

жем качественном составе.

Во второй и третьей группах точки на диаграммах заметно рассредоточены и образуют более дисперсные скопления. Такое расположение указывает на выраженные качественные и количественные расхождения в составе потенциально патогенных и условно-патогенных таксонов между отдельными пациентами этих групп, что указывает на более высокий уровень вариабельности внутри данной выборки.

Подробное распределение потенциально патогенных и условно-патогенных микроорганизмов в образцах, при глубине прочтений не менее 60, представлено в таблицах 4–6. Данные в таблице позволяют сравнить уровни представленности различных патогенных и условно-патогенных таксонов между образцами. Это дает возможность выявить характерные особенности микробиома в исследуемых группах.

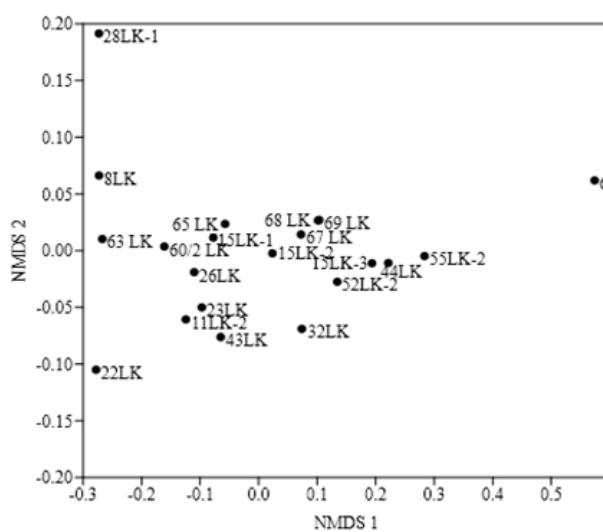


Рис. 3. Диаграмма ординации по β -разнообразию образцов первой группы

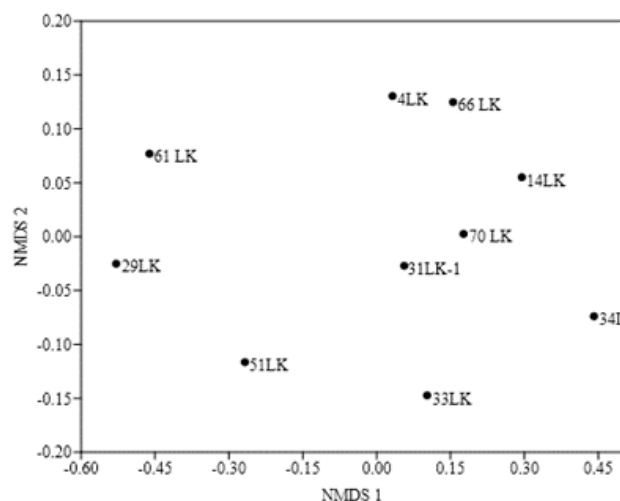


Рис. 4. Диаграмма ординации по β -разнообразию образцов второй группы

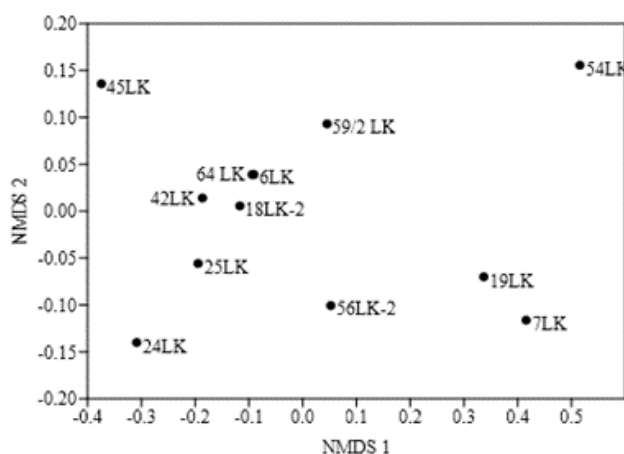


Рис. 5. Диаграмма ординации по β -разнообразию образцов третьей группы

Во всех образцах кишечного микробиота трех исследуемых групп был выявлен *Enterococcus faecalis*. В силу его универсального распространения в пробах, независимо от наличия диагноза ВЗК, можно предположить участие этого микроорганизма в механизмах развития воспалительных процессов в кишечнике.

Для проверки данной гипотезы потребуются дальнейшие исследования влияния *E. faecalis* на состояние кишечной микробиоты и степень воспаления. В дальнейшем мы намерены провести сравнительный анализ вирулентности выделенных штаммов *E. faecalis* в группах пациентов с различной активностью ВЗК, а также оценить их взаимодействие с компонентами микробиоценоза толстой кишки.

Известно, что *E. faecalis* способен проду-

цировать цитокины и медиаторы воспаления, активирующие иммунный ответ. Так, предполагается, что секреция этим патогеном интерлейкина-8 и фактора некроза опухоли α (ФНО α) может способствовать поддержанию хронического воспаления слизистой оболочки кишечника. Повышенная численность *E. faecalis* в микробиоме, независимо от наличия гистологически подтвержденного ВЗК, может свидетельствовать об активации общего воспалительного каскада в кишечнике.

Развитие воспалительных заболеваний кишечника (ВЗК) тесно связано с микробиотой, формирующейся в его среде. При наличии ВЗК разнообразие потенциально патогенных микроорганизмов обычно снижено. Это объясняется активным иммунным ответом организма на воспалительный процесс [17].

Иммунная система эффективно нейтрализует патогены за счет таких механизмов, как фагоцитоз и других. Повышенное разнообразие микробиоты, напротив, может стимулировать иммунитет и делать его более эффективным в противодействии патогенам, в результате чего их разнообразие ограничивается.

Заключение

В результате метатаксономического анализа методом секвенирования фрагментов генов 16S рРНК был проанализирован таксономический состав потенциально патогенных и условно-патогенных таксонов кишечной микробиоты у пациентов трех групп. Анализ образцов кишечного микробиома, полученных от представителей трех исследуемых когорт, продемонстрировал убиквитарное присутствие бактериального штамма *Enterococcus faecalis*. Принимая во внимание его повсеместное распространение в исследуемом материале, вне зависимости от верифицированного диагноза воспалительного заболевания кишечника, представляется обоснованным предположить вовлеченность *Enterococcus faecalis* в патофизиологические механизмы, лежащие в основе развития и прогрессирования воспалительных процессов в желудочно-кишечном тракте. Для проверки этой гипотезы потребуются дальнейшее проведение исследования влияния *E. faecalis* на состояние кишечной микробиоты и степень воспаления.

Таблица 4

Относительное содержание потенциально патогенных и условно-патогенных таксонов в группе 1

	32 LK	60/2 LK	22LK	15LK-2	15LK-3	15LK-1	68 LK	63 LK	8LK	62 LK	23LK	67 LK	44LK	43LK	55LK-2	11LK-2	52LK-2	28LK-1	26LK	65 LK	69 LK
<i>Acinetobacter baumannii</i>	0,01	0,01	0,00	0,00	0,01	0,01	0,00	0,01	0,00	0,01	0,01	0,00	0,01	0,01	0,03	0,01	0,01	0,00	0,01	0,00	0,00
<i>Aeromonas veronii</i>	0,01	0,00	0,00	0,03	0,04	0,02	0,01	0,01	0,00	0,09	0,00	0,02	0,05	0,00	0,07	0,00	0,02	0,00	0,00	0,00	0,01
<i>Bacillus cereus</i>	0,07	0,08	0,06	0,04	0,04	0,04	0,01	0,02	0,03	0,16	0,07	0,02	0,05	0,07	0,04	0,05	0,06	0,00	0,02	0,02	0,01
<i>Citrobacter freundii</i>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,13	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>Clostridioides difficile</i>	0,05	0,05	0,04	0,11	0,13	0,09	0,01	0,05	0,02	0,08	0,06	0,04	0,13	0,04	0,12	0,02	0,05	0,00	0,03	0,02	0,01
<i>Clostridium botulinum</i>	0,13	0,04	0,02	0,22	0,22	0,13	0,01	0,04	0,05	0,02	0,08	0,04	0,04	0,24	0,02	0,04	0,17	0,00	0,17	0,03	0,01
<i>Clostridium perfringens</i>	0,02	0,03	0,03	0,14	0,15	0,08	0,01	0,46	0,01	13,11	0,01	0,04	0,02	0,01	0,01	0,12	0,02	0,01	0,01	0,05	0,01
<i>Edwardsiella tarda</i>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,04	0,00	0,01	0,01	0,00	0,01	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>Enterobacter asburiae</i>	0,00	0,00	0,00	0,01	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,04	0,00	0,00	0,01	0,00	0,02	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>Enterobacter hormaechei</i>	0,02	0,00	0,00	0,04	0,04	0,02	0,00	0,00	0,00	0,04	0,00	0,01	0,07	0,00	0,08	0,00	0,05	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>Enterococcus faecalis</i>	1,51	1,19	0,90	3,09	3,52	2,23	0,94	0,67	0,49	13,73	1,39	2,28	4,24	0,96	6,26	0,58	2,39	0,11	0,71	1,24	0,94
<i>Enterococcus faecium</i>	0,01	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00	0,01	0,01	0,07	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	0,02	0,11	0,04	0,18	0,26	0,11	0,19	0,02	0,04	0,00	0,02	0,02	0,26	0,50	0,01	0,00	0,02	0,00	0,04	0,29	0,19
<i>Fusobacterium varium</i>	0,00	0,00	0,98	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0,14	0,02	0,01	0,19	0,23	0,14	0,02	0,02	0,02	0,47	0,03	0,09	0,35	0,04	0,42	0,03	0,23	0,03	0,02	0,04	0,02
<i>Morganella morganii</i>	0,02	0,01	0,00	0,03	0,03	0,02	0,01	0,03	0,01	5,14	0,00	0,02	0,20	0,00	0,07	0,01	0,03	0,00	0,00	0,02	0,01
<i>Salmonella enterica</i>	0,26	0,04	0,04	0,48	0,55	0,32	0,05	0,05	0,02	1,08	0,03	0,19	0,76	0,05	1,07	0,06	0,49	0,04	0,02	0,10	0,05
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,05	0,10	0,08	0,04	0,06	0,05	0,07	0,12	0,06	0,33	0,21	0,07	0,06	0,10	0,02	0,04	0,04	0,01	0,03	0,07	0,07
<i>Streptococcus agalactiae</i>	0,04	0,01	0,02	0,02	0,02	0,01	0,00	0,01	0,01	0,02	0,05	0,00	0,02	0,02	0,01	0,03	0,03	0,00	0,01	0,00	0,00
<i>Streptococcus equi</i>	0,17	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,01	0,04	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,04	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>Streptococcus iniae</i>	0,03	0,01	0,01	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,01	0,01	0,00	0,00	0,01	0,00	0,01	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	0,07	0,01	0,01	0,01	0,01	0,00	0,00	0,01	0,01	0,02	0,11	0,01	0,08	0,08	0,01	0,03	0,05	0,00	0,01	0,01	0,00
<i>Streptococcus pyogenes</i>	0,24	0,01	0,05	0,04	0,05	0,04	0,00	0,01	0,01	0,03	0,16	0,01	0,05	0,09	0,02	0,12	0,11	0,00	0,02	0,01	0,00

Таблица 5

Относительное содержание потенциально патогенных и условно-патогенных таксонов
в группе 2

	5LK	4LK	61 LK	14LK	33LK	29LK	31LK-1	66 LK	70 LK	34LK
<i>Aeromonas veronii</i>	0,01	0,00	0,04	0,01	0,01	0,10	0,01	0,00	0,01	0,00
<i>Bacillus cereus</i>	0,03	0,00	0,03	0,01	0,20	0,09	0,00	0,03	0,01	0,00
<i>Clostridioides difficile</i>	0,02	0,01	0,06	0,02	0,04	0,14	0,01	0,03	0,06	0,00
<i>Clostridium botulinum</i>	0,02	0,01	0,02	0,00	0,05	0,07	0,00	0,12	0,01	0,00
<i>Clostridium perfringens</i>	0,01	0,04	0,04	0,00	0,05	0,00	0,01	0,02	0,06	0,01
<i>Enterobacter hormaechei</i>	0,09	0,00	0,01	0,00	0,09	0,09	0,01	0,00	0,00	0,00
<i>Enterococcus faecalis</i>	1,13	1,57	5,34	0,58	1,75	8,82	0,32	0,36	0,75	0,07
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0,59	0,03	0,22	0,03	0,67	0,63	0,10	0,01	0,05	0,02
<i>Morganella morganii</i>	0,09	0,00	0,05	0,00	0,08	0,11	0,01	0,00	0,01	0,00
<i>Salmonella enterica</i>	1,43	0,05	0,50	0,03	1,10	1,42	0,15	0,01	0,09	0,03
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,05	0,00	0,04	0,01	1,58	0,03	0,01	0,03	0,22	0,02
<i>Streptococcus pyogenes</i>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,04	0,01	0,01	0,01	0,00

Таблица 6

Относительное содержание потенциально патогенных и условно-патогенных таксонов
в группе 3

	42LK	7LK	18LK-2	25LK	64 LK	59/2 LK	24LK	6LK	19LK	56LK-2	45LK	54LK
<i>Bacillus cereus</i>	0,04	0,01	0,04	0,06	0,04	0,02	0,08	0,04	0,03	0,03	0,04	0,02
<i>Clostridioides difficile</i>	0,07	0,03	0,05	0,05	0,02	0,02	0,06	0,02	0,01	0,04	0,06	0,02
<i>Clostridium botulinum</i>	0,09	0,00	0,11	0,22	0,02	0,02	0,36	0,02	0,02	0,09	0,11	0,03
<i>Clostridium perfringens</i>	0,03	0,00	0,04	0,03	0,03	0,08	0,17	0,03	0,01	0,01	0,03	0,01
<i>Enterococcus faecalis</i>	0,99	0,49	1,05	0,79	0,71	0,99	0,78	0,71	0,53	0,40	1,37	0,32
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	0,00	0,01	0,01	0,07	0,01	0,04	0,04	0,01	0,00	0,00	0,12	0,07
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0,02	0,03	0,06	0,02	0,02	0,04	0,03	0,02	0,02	0,01	0,07	0,02
<i>Salmonella enterica</i>	0,02	0,02	0,09	0,02	0,03	0,10	0,04	0,03	0,03	0,01	0,11	0,03
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,05	0,01	0,03	0,05	0,03	0,11	0,11	0,03	0,01	0,04	0,05	0,06
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	0,00	0,00	0,00	0,02	0,00	0,01	0,04	0,00	0,00	0,00	0,04	0,00
<i>Streptococcus pyogenes</i>	0,05	0,05	0,03	0,05	0,01	0,01	0,07	0,01	0,01	0,02	0,09	0,01

Для сравнения α -разнообразия потенциально патогенных и условно-патогенных микроорганизмов были рассчитаны индексы Шенона и Пизлоу. Применение теста Крускала-Уоллиса не выявило достоверных различий в медианных значениях индексов между группами пациентов.

Оценка β -разнообразия позволила провести сравнительный анализ структуры микробных сообществ. Было обнаружено, что в первой группе пациентов наименьшее β -разнообразие с максимально унифицированным составом потенциально патогенных/условно-патогенных таксонов, в то время как во второй и третьей группах было выявлено более высокое β -разнообразие, свидетельствующее о большей вариабельности внутри групп.

Проведенное исследование позволило получить новые данные о сравнительном анализе таксономического состава и структуры сообществ потенциально патогенных и условно патогенных микроорганизмов кишечника у пациентов с различными формами воспалительных заболеваний кишечника. Полученные в настоящем исследовании данные о снижении α -разнообразия потенциально патогенных микроорганизмов при ВЗК согласуются с результатами других авторов [17, 18]. Это может быть связано с активацией иммунитета в ответ на воспаление. В то же время ряд исследований указывает на важную роль общего разнообразия кишечной микробиоты в поддержании гомеостаза и эффективности противомикробной защиты [19, 20]. Данный аспект требует дальнейшего тщательного изучения для понимания всех механизмов дисбиоза при воспалительных заболеваниях кишечника.

Анализ таксономического разнообразия кишечной микробиоты может обеспечить получение значимой информации о ее потенциальной роли в патогенезе хронических воспалительных заболеваний кишечника. Это, в свою очередь, может прояснить механизмы развития и течения данной патологии.

Перспективным представляется детальное изучение влияния отдельных таксонов микробиоты на клинические проявления и течение ВЗК.

Список использованных источников

1. Recent advances in the understanding of

inflammatory bowel disease / J. Liu [et al.] // *Zhonghua Neike Zazhi*. – 2019. – Vol. 58, № 3. – P. 178–183.

2. Host-microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease / L. Jostins [et al.] // *Nature*. – 2012. – Vol. 491, № 7 422. – P. 119–124.

3. Kaser, A. Inflammatory bowel disease / A. Kaser, S. Zeissig, R. S. Blumberg // *Annu Rev Immunol*. – 2010. – Vol. 28. – P. 573–621.

4. Family history of inflammatory bowel disease alters the phenotype of affected members / J. Levine [et al.] // *Inflamm Bowel Dis*. – 2014. – Vol. 20, № 9. – P. 1 572.

5. Shi, J. Diet in the integrative management of inflammatory bowel diseases / J. Shi, L. Albenberg, G. D. Wu // *Gut Microbes*. – 2017. – Vol. 8, № 1. – P. 126–140.

6. Dolan, K. Diet, gut microbes, and the pathogenesis of inflammatory bowel diseases / K. Dolan, E. Chang // *Mol Nutr Food Res*. – 2017. – P. 61–80.

7. Babraham Bioinformatics [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>. – Дата доступа: 18.03.2024.

8. Mucin dynamics and enteric pathogens / M. A. McGuckin [et al.] // *Nat Rev Microbiol*. – 2011. – Vol. 9. – P. 265–278.

9. Zhang, M.-Y. Role of Regenerating Islet-Derived Protein 3A in Gastrointestinal Cancer / M.-Y. Zhang, J. Wang, J. Guo // *Frontiers in Oncology*. – 2019. – Vol. 9. – P. 1 449.

10. Diversity of the human intestinal microbial flora / P. B. Eckburg [et al.] // *Science*. – 2005. – Vol. 308. – P. 1 635–1 638.

11. Strains, functions and dynamics in the expanded Human Microbiome Project / J. Lloyd-Price [et al.] // *Nature*. – 2016. – Vol. 536, № 7 606. – P. 263–267.

12. Sassone-Corsi, M. No vacancy: how beneficial microbes cooperate with immunity to provide colonization resistance to pathogens / M. Sassone-Corsi, M. Raffatellu // *J. Immunol*. – 2015. – Vol. 194, № 6. – P. 2 807–2 813.

13. Effect of proton pump inhibitors and antibiotics on the gut microbiome of hospitalised older persons / C. O'Donoghue [et al.] // *J. Infect*. – 2016. – Vol. 72, № 4. – P. 498–500.

14. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-

- generation sequencing-based diversity studies / A. Klindworth [et al.] // *Nucleic Acids Res.* – 2013. – Vol. 41, № 1. – e1.
15. The SILVA ribosomal RNA gene database project: Improved data processing and web-based tools / C. Quast [et al.] // *Nucleic Acids Res.* – 2013. – Vol. 41. – P. 590–596.
16. Introducing mothur: Open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities / P. D. Schloss [et al.] // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2009. – Vol. 75. – P. 7 537–7 541.
17. Gut microbiota in health and disease / I. Sekirov [et al.] // *Physiol Rev.* – 2010. – Vol. 90. – P. 859–904.
18. Reduced diversity of faecal microbiota in Crohn's disease revealed by a metagenomic approach / C. Manichanh [et al.] // *Gut.* – 2006. – Vol. 55, № 2. – P. 205–211.
19. Round, J. L. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease / J. L. Round, S. K. Mazmanian // *Nature Reviews Immunology.* – 2009. – Vol. 9, № 5. – P. 313–323.
20. Belkaid, Y. Role of the microbiota in immunity and inflammation / Y. Belkaid, T. W. Hand // *Cell.* – 2014. – Vol. 157, № 1. – P. 121–141.
21. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies / A. Klindworth [et al.] // *PLoS One.* – 2013. – Vol. 8, № 1. – e54608.
22. RefSeq: NCBI Reference Sequence Database [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/>. – Дата доступа: 18.03.2024.
23. Pathogen Detection [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pathogens/>. – Дата доступа: 18.03.2024.

**A. V. Gorbach¹, E. P. Mikhalenka¹, O. Ch. Mazur¹, L. I. Kastukevich², O. N. Romanova²,
K. Y. Marakhovsky³, O. N. Nazarenko², A. V. Kilchevsky¹**

DIVERSITY OF PATHOGENIC MICROBIOME TAXA IN CHILDREN WITH INFLAMMATORY BOWEL DISEASE

¹State Scientific Institution

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

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

e-mail: a.gorbach@igc.by

²Educational Institution

“Belarusian State Medical University”

83 Dzerzhinsky Ave., 220083 Minsk, the Republic of Belarus

³State Institution

“Republican Scientific and Practical Centre for Children’s Surgery”

64A Nezavisimosti Ave., 220013 Minsk, the Republic of Belarus

The article presents the study results on the taxonomic composition of potentially pathogenic and conditionally pathogenic microorganisms of the intestinal microbiota in 43 patients with inflammatory bowel diseases. Using metataxonomic analysis, by sequencing 16S rRNA gene fragments, the taxonomic composition of microorganisms was established. Shannon and Pielou indices were calculated for the quantitative assessment of α - and β -diversity of potentially pathogenic and conditionally pathogenic taxa among the three groups of patients, and the ordination of samples was performed. According to the statistical analysis results, significant differences between the groups were not observed. The obtained quantitative characteristics may contribute to the development of new approaches in the diagnosis and treatment of inflammatory bowel diseases.

Keywords: inflammatory bowel diseases, microbiome, taxonomic composition, 16S rRNA gene sequencing, dysbiosis.

Дата поступления в редакцию: 31 августа 2023 г.

Д. А. Кучерявая¹, М. Д. Амелянович¹, В. Д. Румянцева², Т. О. Сухан², И. И. Саванович²,
А. В. Чуприна³, О. Е. Полулях³, Т. Б. Мелик-Касумов³, П. М. Морозик¹

АНАЛИЗ АССОЦИИ ПОЛИМОРФНЫХ ВАРИАНТОВ ГЕНОВ МЕТАБОЛИЗМА ВИТАМИНОВ СО СТАТУСОМ ВИТАМИНА D У СПОРТСМЕНОВ

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

e-mail: M.Ameliyanovich@igc.by

²Государственное учреждение
«Республиканский научно-практический центр спорта»
Республика Беларусь, 220062, г. Минск, ул. Нарочанская, 8

³Государственное научное учреждение
«Институт физиологии Национальной академии наук Беларуси»
Республика Беларусь, 220072, г. Минск, ул. Академическая, 28

Организация рационального питания в спорте является одним из факторов, обеспечивающих эффективность тренировочного процесса, адаптацию, работоспособность, восстановление и спортивные достижения. Разработка метода молекулярно-генетической персонификации витаминной поддержки спортсменов послужит основой для нового подхода к проблеме индивидуального подбора рациона питания с учетом генетических особенностей. В данном исследовании проведен анализ ассоциации молекулярно-генетических маркеров метаболизма витаминов с концентрацией, а также риском недостаточности витамина D в крови спортсменов. Показано, что полиморфные варианты rs10741657 гена *CYP2R1* (OR = 0,41; 95% CI 0,19–0,84; p = 0,01), rs602662 гена *FUT2* (OR = 5,26; 95% CI 1,37–30,00; p = 0,008) и rs1801198 гена *TCN2* (OR = 0,43; 95% CI 0,21–0,89; p = 0,02) связаны с риском недостатка витамина D. Кроме того, у носителей генотипа A/A полиморфного варианта rs602662 выявлена более низкая концентрация витамина D в крови по сравнению с носителями генотипов A/G и G/G ($\chi^2 = 8,808$; p = 0,012).

Ключевые слова: ДНК-диагностика, спортсмены, витамин D, метаболизм витаминов, нутригеномика, нутритивный статус.

Введение

Витамины выступают регуляторами метаболических процессов, многие из которых имеют решающее значение для адекватного выполнения физических нагрузок. Одним из важных условий реализации адаптационного потенциала организма спортсменов, повышения эффективности тренировок, ускорения восстановительных процессов после значительных физических и психоэмоциональных нагрузок, сохранения работоспособности в соревновательном цикле является адекватная обеспеченность организма спортсменов витаминами [1].

Исследования показали, что в период интенсивных тренировок возможна недостаточ-

ная обеспеченность организма спортсмена отдельными витаминами. При этом дефицит витаминов оказывает негативное влияние на физическую работоспособность, потребление кислорода, выносливость, мышечную силу, и может служить фактором, снижающим скорость течения восстановительных процессов после интенсивной мышечной работы [2].

Все это обосновывает важность исследования витаминного статуса спортсменов, с целью разработки персонализированного подхода в составлении плана питания спортсменов, основанного на молекулярно-генетических данных.

Витамин D может участвовать в энергетике мышечных клеток и минерализации костей благодаря своему влиянию на кальций. Поэто-

му для спортсменов особенно важно поддерживать нормальный уровень витамина D, так как его дефицит может привести к ухудшению мышечной силы и повышенному риску переломов, которые составляют от 0,7 до 20% всех клинических травм в спортивной медицине. Для формирования и поддержания целостности костной ткани требуется достаточное количество кальция и витамина D. Показано, что витамин D влияет на состояние костной ткани путем активации экспрессии генов, которые регулируют абсорбцию кальция в тонком кишечнике и его реабсорбцию в почках [3]. Витамин D также способствует мобилизации кальция костной ткани посредством остеокластогенеза [4].

Витамин D является мощным модулятором физиологии скелетных мышц, влияя на их рост и дифференцировку [5, 6]. Что касается физических упражнений и их влияния на спортсменов, утверждается, что низкий уровень витамина D может напрямую влиять на мышечную силу и производительность. Исследования молодых и пожилых людей, не занимающихся спортом, выявили отрицательную корреляцию между низким уровнем витамина D и маркерами мышечной силы [4, 5]. Показано, что 93% пациентов, у которых были общие клинические симптомы неспецифической скелетно-мышечной боли, имели дефицит витамина D [6]. Витамин D влияет на синтез мышечных белков, концентрацию АТФ, силу, высоту прыжка, скорость и мощность прыжка, а также способность выполнять аэробные и силовые упражнения. Физическую работоспособность можно значительно улучшить и/или сохранить при достаточном уровне витамина D [7].

Исходя из вышеизложенного, целью настоящей работы являлся анализ ассоциации полиморфных вариантов генов, кодирующих ферменты, вовлеченные в метаболизм витаминов, с уровнем витамина D у спортсменов. В исследование были включены полиморфные варианты генов, для которых ранее была показана ассоциация с уровнем витаминов и/или другое воздействие на метаболизм витаминов.

Материалы и методы

Группа для исследования

Для формирования группы испытуемых

были сформулированы следующие критерии включения:

- спортсмены возрастом 14 лет и старше;
- спортсмены сборных команд, спортивный резерв в годичном макроцикле подготовки.

Критерии исключения: острые инфекционные заболевания.

В рамках исследования 139 спортсменов, соответствующих критериям включения/исключения, подписали информированное согласие участника и согласие на обработку персональных данных.

Исследование было рассмотрено и утверждено на заседании комитета по биоэтике Государственного научного учреждения «Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси» (протокол заседания от 08.06.2021 № 2).

Определение уровня витамина D в сыворотке крови спортсменов

Забор крови натощак для биохимического и электрохемилюминесцентного анализов крови осуществлялся в РНПЦ спорта из локтевой вены утром, не ранее чем через 10–12 ч после последнего приема пищи, в стерильную вакуумную пробирку Vacutainer. Определение витамина D проводили в сыворотке крови спортсменов, используя коммерческий ИФА-набор Architect 25-ОН D vitamin (Abbott Diagnostics, США). В соответствии с рекомендациями Российской ассоциации эндокринологов по интерпретации результатов определения сывороточного 25(ОН)D спортсмены были разделены на группы: недостаток и дефицит витамина D ($D < 30$ нг/мл, 71 человек) и нормальный уровень витамина D ($D > 30$ нг/мл, 68 человек) [8].

Методы молекулярно-генетического анализа

В качестве биологического материала использовали ДНК, выделенную из лейкоцитов крови. Выделение ДНК осуществлялось на многофункциональной автоматической станции Eppendorf epMotion 5075 с использованием наборов реагентов для выделения нуклеиновых кислот на магнитных частицах «Арт НК Магнит» (ООО «АртБиоТех», Беларусь) в соответствии с инструкцией производителя.

Молекулярно-генетический анализ выполнен методом полимеразной цепной реакции с детекцией результата в режиме реального времени (real-time PCR) в соответствии

с разработанными протоколами тестирования полиморфных вариантов генов. В исследование были включены полиморфные варианты генов, участвующих в метаболизме витаминов: *NADSYN1* (Glutamine-Dependent NAD Synthetase) [9], *CYP2R1* (Cytochrome P450 Family 2 Subfamily R Member 1) [10], *FUT2* (Fucosyltransferase 2) [11], *TCN2* (Transcobalamin 2) [12, 13], *GC* (GC Vitamin D Binding Protein) [14], *VDR* (Vitamin D Receptor) [10], *CYP24A1* (Cytochrome P450 Family 24 Subfamily A Member 1) [15], *MTHFR* (Methylenetetrahydrofolate Reductase) [16], *MTR* (5-Methyltetrahydrofolate-Homocysteine Methyltransferase) [17] и *SLC22A1* (Solute Carrier Family 22 Member 1) [18].

Статистическая обработка данных

Для анализа распределения частот генотипов в группах спортсменов с низким (>30 нг/мл) и нормальным (<30 нг/мл) уровнями витамина D и оценки влияния полиморфных вариантов на риск недостаточного уровня витамина D использовалась функция *fisher.test* пакета *stats* (version 3.6.2) на языке программирования R. Данная функция осуществляет расчет р-значимости методом точного критерия Фишера, а также расчет отношения шансов (OR) и 95% доверительного интервала (95% CI).

Для оценки влияния полиморфных вари-

антов на уровень витамина D был проведен тест Краскела-Уоллиса, т. к. распределение концентраций витамина D отличалось от нормального.

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

Результаты и обсуждение

Ассоциация полиморфных вариантов исследуемых генов с уровнем витаминов D

Проведено тестирование 139 образцов по 15 ДНК-маркерам, которые влияют на различные этапы метаболизма витаминов.

Не вызывает сомнений, что на индивидуальные особенности метаболизма витаминов, помимо рациона питания, существенное влияние оказывают генетические факторы. В таблице 1 представлены медиана, 25-й и 75-й процентиля значений концентрации витамина D, а также χ^2 и *p-value* критерия Краскела-Уоллиса для групп генотипов по каждому из протестированных вариантов.

Выявлена ассоциация полиморфного варианта rs602662 с уровнем витамина D ($\chi^2 = 8,808$; *p-value* = 0,012). На рисунке 1 показано, что для носителей генотипа А/А характерна значительно более низкая концентрация витамина D, чем для других генотипов (для генотипа G/G — максимальная,

Таблица 1

Ассоциация уровня витамина D с полиморфными вариантами исследуемых генов среди спортсменов

Ген	Вариант	Генотип	Концентрации витамина D, нг/мл, медиана [25-й; 75-й процентиля]	χ^2	<i>p-value</i>
<i>NADSYN1</i>	rs12785878	G/G	32,2 [27,5; 42,8]	2,129	0,345
		G/T	27,6 [17,0; 35,4]		
		T/T	29,8 [20,0; 39,1]		
<i>NADSYN1</i>	rs3829251	A/A	29,8 [27,5; 46,6]	0,500	0,779
		A/G	27,4 [18,2; 35,4]		
		G/G	30,6 [20,1; 38,7]		
<i>CYP2R1</i>	rs10741657	A/A	23,2 [15,4; 39,0]	2,863	0,239
		A/G	32,8 [23,5; 37,8]		
		G/G	25,4 [18,6; 35,2]		
<i>FUT2</i>	rs602662	A/A	18,2 [15,2; 26,3]	8,808	0,012
		A/G	30,7 [20,0; 40,3]		
		G/G	32,2 [23,4; 37,7]		

Окончание таблицы 1

Ген	Вариант	Генотип	Концентрации витамина D, нг/мл, медиана [25-й; 75-й процентили]	χ^2	p-value
TCN2	rs1801198	C/C	25,4 [20,3; 39,9]	2,188	0,335
		G/C	32,1 [22,0; 38,6]		
		G/G	24,2 [15,8; 33,1]		
GC	rs17467825	A/A	30,8 [20,1; 38,0]	2,374	0,305
		A/G	29,9 [20,0; 40,6]		
		G/G	25,0 [16,4; 31,2]		
	rs4588	A/A	25,1 [16,7; 33,4]	1,548	0,461
		C/A	29,9 [20,0; 40,6]		
		C/C	30,7 [20,1; 37,3]		
	rs2282679	G/G	25,1 [16,7; 33,4]	1,548	0,461
		G/T	29,9 [20,0; 40,6]		
		T/T	30,7 [20,1; 37,3]		
VDR	rs10783219	A/A	29,1 [20,6; 36,5]	2,065	0,356
		A/T	30,0 [16,6; 37,3]		
		T/T	32,7 [23,4; 40,5]		
CYP24A1	rs6013897	A/A	22,2 [17,4; 23,5]	2,125	0,346
		A/T	29,8 [20,5; 37,3]		
		T/T	30,7 [19,5; 39,1]		
MTHFR	rs1801133	C/C	30,7 [20,0; 36,0]	3,008	0,222
		C/T	29,4 [21,0; 40,4]		
		T/T	24,4 [13,6; 31,6]		
	rs1801131	A/A	27,4 [16,6; 38,3]	0,494	0,781
		A/C	30,7 [20,8; 37,9]		
		C/C	33,4 [21,6; 38,6]		
MTR	rs1805087	A/A	30,7 [20,4; 37,7]	0,779	0,678
		A/G	25,0 [16,4; 37,3]		
		G/G	27,3 [18,2; 40,2]		
SLC22A1	rs622342	A/A	30,0 [18,8; 40,3]	3,440	0,179
		C/A	32,5 [22,2; 37,5]		
		C/C	23,9 [17,3; 31,1]		
	rs12208357	C/C	30,8 [21,5; 38,4]	3,985	0,136
		C/T	22,9 [16,0; 37,4]		
		T/T	12,5 [12,5; 12,5]		

для гетерозиготного генотипа A/G выявлена промежуточная концентрация).

Полиморфный вариант rs602662 гена *FUT2* находится в одном блоке неравновесного сцепления ($D' = 1$) с нонсенс заменой W143X того же гена, приводящей

к инактивации $\alpha(1,2)$ фукозилтрансферазы и нарушению синтеза растворимых A- и B-антигенов группы крови АВ0. Гомозиготные носители минорного аллеля данного полиморфного варианта не способны экспрессировать антигены группы

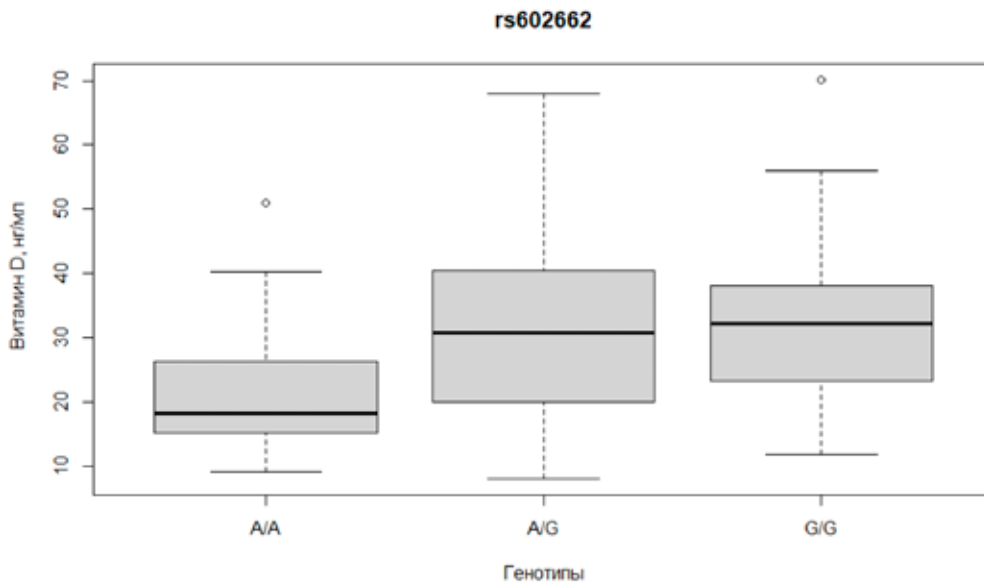


Рис. 1. График распределения концентрации витамина D (нг/мл) в зависимости от генотипа по полиморфному варианту rs602662 гена *FUT2*

крови на слизистых оболочках и выделениях [19], что снижает защитную функцию слюны, повышает риск инфекционных заболеваний, нарушает процессы образования микрофлоры кишечника [20]. Предполагается, что нарушение микрофлоры кишечника, большая распространенность *H. pylori* и заболеваний желудочно-кишечного тракта определяет более низкую концентрацию витамина B12 в крови носителей минорного аллеля А полиморфного варианта rs602662 [11]. Однако в открытом доступе не удалось найти информацию о связи данного полиморфного варианта с концентрацией в крови или метаболизмом витамина D.

Для определения связи полиморфных

вариантов с риском недостаточности витамина D, был проведен анализ частот распределения генотипов в группах спортсменов с нормальным уровнем витамина D ($D > 30$ нг/мл), а также с дефицитом и недостатком ($D < 30$ нг/мл) витамина D в крови.

В таблице 2 приведено распределение частот генотипов в группах, данные отношения шансов (OR) с учетом 95% доверительного интервала (CI), а также p-value.

Как видно из таблицы 2, генотип А/А варианта rs602662 оказался статистически значимо связан с риском развития недостатка или дефицита витамина D у спортсменов (OR = 5,26; 95% CI 1,37–30,01; p = 0,008). Кроме того, гетерозиготные носители полиморфных вариантов

Таблица 2

Анализ ассоциации полиморфных вариантов генов с риском недостатка и дефицита витамина D у спортсменов

Вариант	Генотип	Дефицит и недостаток	Норма	OR (95% CI)	p-value
rs12785878	G/G	5 (7%)	9 (13,2%)	0,50 (0,12–1,77)	0,27
	G/T	28 (39,4%)	22 (32,4%)	1,36 (0,64–2,90)	0,48
	T/T	38 (53,5%)	37 (54,4%)	0,97 (0,47–1,98)	1,00
rs10741657	A/A	18 (25,4%)	11 (16,2%)	1,75 (0,71–4,52)	0,21
	A/G	27 (38%)	41 (60,3%)	0,41 (0,19–0,84)	0,01
	G/G	26 (36,6%)	16 (23,5%)	1,87 (0,84–4,24)	0,10

Окончание таблицы 2

Вариант	Генотип	Дефицит и недостаток	Норма	OR (95% CI)	p-value
rs602662	A/A	14 (19,7%)	3 (4,4%)	5,26 (1,37–30,01)	0,008
	A/G	35 (49,3%)	39 (57,4%)	0,72 (0,35–1,49)	0,40
	G/G	22 (31%)	26 (38,2%)	0,73 (0,34–1,55)	0,38
rs1801198	C/C	27 (38%)	17 (25%)	1,83 (0,84–4,10)	0,11
	G/C	30 (42,3%)	43 (63,2%)	0,43 (0,2–0,89)	0,02
	G/G	14 (19,7%)	8 (11,8%)	1,83 (0,66–5,45)	0,25
rs17467825	A/A	31 (43,7%)	35 (51,5%)	0,73 (0,35–1,5)	0,40
	A/G	29 (40,8%)	29 (42,6%)	0,93 (0,45–1,93)	0,86
	G/G	11 (15,5%)	4 (5,9%)	2,91 (0,81–13,23)	0,10
rs4588	A/A	11 (15,5%)	5 (7,4%)	2,30 (0,69–8,95)	0,18
	C/A	29 (40,8%)	29 (42,6%)	0,93 (0,45–1,93)	0,86
	C/C	31 (43,7%)	34 (50%)	0,78 (0,38–1,59)	0,50
rs10783219	A/A	28 (39,4%)	23 (33,8%)	1,27 (0,6–2,7)	0,60
	A/T	31 (43,7%)	31 (45,6%)	0,93 (0,45–1,91)	0,87
	T/T	12 (16,9%)	14 (20,6%)	0,79 (0,3–2,01)	0,67
rs6013897	A/A	3 (4,2%)	0 (0%)	Inf (0,4–Inf)	0,24
	A/T	17 (23,9%)	16 (23,5%)	1,02 (0,43–2,42)	1,00
	T/T	51 (71,8%)	52 (76,5%)	0,79 (0,34–1,8)	0,57
rs2282679	G/G	11 (15,5%)	5 (7,4%)	2,30 (0,69–8,95)	0,18
	G/T	29 (40,8%)	29 (42,6%)	0,93 (0,45–1,93)	0,86
	T/T	31 (43,7%)	34 (50%)	0,78 (0,38–1,59)	0,50
rs3829251	A/A	3 (4,2%)	3 (4,4%)	0,96 (0,12–7,4)	1,00
	A/G	19 (26,8%)	14 (20,6%)	1,41 (0,6–3,37)	0,43
	G/G	49 (69%)	51 (75%)	0,74 (0,33–1,67)	0,46
rs1801133	C/C	32 (45,1%)	36 (52,9%)	0,73 (0,35–1,50)	0,40
	C/T	31 (43,7%)	28 (41,2%)	1,11 (0,54–2,29)	0,86
	T/T	8 (11,3%)	4 (5,9%)	2,02 (0,51–9,65)	0,37
rs1801131	A/A	39 (54,9%)	30 (44,1%)	1,54 (0,75–3,18)	0,24
	A/C	27 (38%)	32 (47,1%)	0,69 (0,33–1,43)	0,31
	C/C	5 (7%)	6 (8,8%)	0,78 (0,18–3,26)	0,76
rs1805087	A/A	42 (59,2%)	46 (67,6%)	0,69 (0,33–1,47)	0,38
	A/G	23 (32,4%)	18 (26,5%)	1,33 (0,60–2,97)	0,46
	G/G	6 (8,5%)	4 (5,9%)	1,47 (0,33–7,44)	0,75
rs622342	A/A	36 (50,7%)	36 (52,9%)	0,91 (0,45–1,88)	0,87
	C/A	22 (31%)	27 (39,7%)	0,68 (0,32–1,45)	0,29
	C/C	13 (18,3%)	5 (7,4%)	2,80 (0,87–10,68)	0,08
rs12208357	C/C	52 (73,2%)	59 (86,8%)	0,42 (0,15–1,08)	0,06
	C/T	18 (25,4%)	9 (13,2%)	2,21 (0,86–6,10)	0,09
	T/T	1 (1,4%)	0 (0%)	Inf (0,02–Inf)	1

rs10741657 и rs1801198 имеют сниженный риск дефицита и недостатка витамина D (OR = 0,41; 95% CI 0,19–0,84; $p = 0,01$; и OR = 0,43; 95% CI 0,21–0,89; $p = 0,02$, соответственно).

Полиморфный вариант rs10741657 представляет собой замену A > G и расположен рядом с геном *CYP2R1*, который кодирует фермент суперсемейства цитохрома P450. Фермент, кодируемый геном *CYP2R1*, выступает в качестве микросомальной гидроксилазы витамина D, что преобразует витамин D в активный лиганд [10].

В ходе исследования полногеномного поиска ассоциации (GWAS) было установлено, что вариант rs10741657 связан с уровнем 25(OH)D у европейцев [21]. Для носителей генотипа A/A варианта rs10741657 был показан более высокий уровень витамина D в немецкой популяции пациентов с сахарным диабетом 1-го типа [22] и датской выборке детей [23], а для мажорного аллеля G — более низкий уровень витамина D среди населения Сингапура [24]. Для носителей генотипа A/A показано более значительное повышение уровня витамина D в ответ на воздействие UVB лучей (93,7 нмоль/л для A/A; 81,9 нмоль/л для A/G; 77,0 нмоль/л для G/G) [25]. Кроме того, спустя год употребления дополнительного витамина D для носителей редкого аллеля A было показано менее значительное повышение уровня 25(OH)D в крови [26]. Однако в исследовании с привлечением беременных женщин аллель G был ассоциирован с менее значительным ростом уровня 25(OH)D спустя несколько недель приема холекальциферола ($\beta = -4,1$ нмоль/л) [27].

Полиморфный вариант rs1801198 представляет собой замену 776C > G в гене *TCN2* и является наиболее часто встречающимся полиморфизмом данного гена в европейской популяции [28]. Ген *TCN2* кодирует транскобаламин, который осуществляет транспорт кобаламина (витамин B12) из кишечника к клеткам, образуя голотранскобаламин (комплекс транскобаламина с витамином B12). Вариант rs1801198 приводит к замене пролина на аргинин в позиции 259 белка TCN2. Это ведет к ухудшению способности транско-

баламина связываться с витамином B12, что выражается в снижении концентрации голотранскобаламина в крови и, соответственно, доступности витамина для тканей организма даже при адекватном его потреблении с пищей [12]. Метаанализ [29] показал, что у носителей генотипа G/G полиморфного варианта rs1801198 наблюдается значительно более низкая концентрация голотранскобаламина и более высокая гомоцистеина. При недостатке кобаламина повышается концентрация гомоцистеина и метилмалоновой кислоты в крови, что является фактором риска развития тромбоза и тромбоэмболии [13]. Выявление механизмов ассоциации этого гена с уровнем витамина D требует дальнейшего, более глубокого изучения.

Заключение

В ходе выполнения исследования была выявлена ассоциация генетических локусов с уровнем (rs602662 гена *FUT2*) и риском недостаточности/дефицита (rs10741657 гена *CYP2R1*, rs602662 гена *FUT2*, rs1801198 гена *TCN2*) витамина D в крови у спортсменов. В дальнейшем данные результаты могут послужить основой для разработки методов персонализированной оценки риска недостатка витамина D, а также генетически обоснованной коррекции рациона спортсменов в периоды спортивной подготовки и соревнований. При этом в литературных источниках для полиморфных вариантов rs602662 гена *FUT2* и rs1801198 гена *TCN2* показана вовлеченность в метаболизм витамина B12 [13, 12]. Связь данных полиморфизмов с концентрацией и метаболизмом витамина D требует дальнейших исследований.

Список использованных источников

1. IOC consensus statement: dietary supplements and high-performance athletes / R. J. Maughan [et al.] // Br J Sports Med. – 2018. – Vol. 52, iss. 4. – P. 439–455.
2. Gayton, A. C. Textbook of medicinal physiology / A. C. Gayton, J. E. Hall // 11th Ed. Philadelphia, Pennsylvania: Elsevier, 2006. – 1 116 p.
3. Holick, M. F. Vitamin D: Photobiology, metabolism, mechanism of action, and clinical applications / M. F. Holick, M. Garabedian // Primer

- on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism / American Society for Bone and Mineral Research. – 6th ed. – Washington, DC, USA, 2006. – P. 129–137.
4. The intensity level of physical exercise and the bone metabolism response / L. Maimoun [et al.] // *Int. J. Sports Med.* – 2006. – Vol. 27, iss. 2. – P. 105–111.
5. The roles of vitamin D in skeletal muscle: Form, function, and metabolism / C. M. Girgis [et al.] // *Endocr. Rev.* – 2013. – Vol. 34, iss. 1. – P. 33–83.
6. Higher serum 25-hydroxyvitamin D concentrations associate with a faster recovery of skeletal muscle strength after muscular injury / T. Barker [et al.] // *Nutrients.* – 2013. – Vol. 5, iss. 4. – P. 1 253–1 275.
7. Black, P. N. Relationship between serum 25-Hydroxyvitamin D and pulmonary function in the Third National Health and Nutrition Examination Survey / P. N. Black, R. Scragg // *Chest.* – 2005. – Vol. 128, iss. 6. – P. 3 792–3 798.
8. Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D deficiency: an Endocrine Society clinical practice guideline / M. F. Holick [et al.] // *The Journal of clinical endocrinology and metabolism.* – 2011. – Vol. 96, iss. 7. – P. 1 911–1 930.
9. Vitamin D and Mortality: A Mendelian Randomization Study / O. Trummer [et al.] // *Clinical Chemistry.* – 2013. – Vol. 59, № 5. – P. 793–797.
10. Genecards [Electronic resource]. – Mode of access: <https://www.genecards.org/>. – Date of access: 07.12.2023.
11. Common variants of *FUT2* are associated with plasma vitamin B12 levels / A. Hazra [et al.] // *Nature Genetics.* – 2008. – Vol. 40, iss. 10. – P. 1 160–1 162.
12. Single nucleotide polymorphisms in the transcobalamin gene: relationship with transcobalamin concentrations and risk for neural tube defects / L. A. Afman [et al.] // *Eur J Hum Genet.* – 2002. – Vol. 10, iss. 7. – P. 433–438.
13. Hyperhomocysteinemia is common in patients with antiphospholipid syndrome and may contribute to expression of major thrombotic events / I. Avivi [et al.] // *Blood Coagul Fibrinolysis.* – 2002. – Vol. 13, iss. 2. – P. 169–172.
14. Hypovitaminosis D in a Young Lebanese Population: Effect of GC Gene Polymorphisms on Vitamin D and Vitamin D Binding Protein Levels: Effect of GC SNPs on Vitamin D and VDBP / M. Medlej-Hashim [et al.] // *Annals of Human Genetics.* – 2015. – Vol. 79, № 6. – P. 394–401.
15. Jones, G. 25-Hydroxyvitamin D-24-hydroxylase (CYP24A1): Its important role in the degradation of vitamin D / G. Jones, D. E. Prosser, M. Kaufmann // *Archives of Biochemistry and Biophysics* – 2012. – Vol. 523, № 1. – P. 9–18.
16. The Association between Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR) Mutations and Serum Biomarkers of Cardiac Health / H. K. Krishnamurthy [et al.] // *Open Journal of Preventive Medicine.* – 2023. – Vol. 13, № 4. – P. 87–107.
17. Importance of gene variants and co-factors of folate metabolic pathway in the etiology of idiopathic intellectual disability / S. Dutta [et al.] // *Nutritional Neuroscience.* – 2011. – Vol. 14, iss. 5. – P. 202–209.
18. Organic cation transporter 1 (OCT1) modulates multiple cardiometabolic traits through effects on hepatic thiamine content / X. Liang [et al.] // *PLOS Biology.* – 2018. – Vol. 16, № 4. – P. e2002907.
19. *FUT2* Nonsecretor Status Links Type 1 Diabetes Susceptibility and Resistance to Infection / D. J. Smyth [et al.] // *Diabetes.* – 2011. – Vol. 60, iss. 11. – P. 3 081–3 084.
20. Frequency of ABH secretors and non secretors: A cross sectional study in Karachi / M. Saboor [et al.] // *Pak J Med Sci.* – 2014. – Vol. 30, iss. 1. – P. 189–193.
21. Common genetic determinants of vitamin D insufficiency: a genome-wide association study / T. J. Wang [et al.] // *The Lancet.* – 2010. – Vol. 376, iss. 9 736. – P. 180–188.
22. *CYP2R1* (vitamin D 25-hydroxylase) gene is associated with susceptibility to type 1 diabetes and vitamin D levels in Germans / E. Ramos-Lopez [et al.] // *Diabetes Metab. Res. Rev.* – 2007. – Vol. 23, iss. 8. – P. 631–636.
23. Vitamin D-related genes and cardiometabolic markers in healthy children: a Mendelian randomisation study / A. Lopez-Mayorga [et al.] // *Br J Nutr.* – 2020. – Vol. 123, iss. 10. – P. 1 138–1 147.
24. Genetic and environmental predictors of serum 25-hydroxyvitamin D concentrations among middle-aged and elderly Chinese in Singapore / K. Robien [et al.] // *Br J Nutr.* – 2013. – Vol. 109, iss. 3. – P. 493–502.
25. Common variants in *CYP2R1* and GC genes are both determinants of serum 25-hydroxyvitamin D concentrations after UVB irradiation

and after consumption of vitamin D3–fortified bread and milk during winter in Denmark / J. Nissen [et al.] // The American Journal of Clinical Nutrition. – 2015. – Vol. 101, iss. 1. – P. 218–227.

26. Large Individual Differences in Serum 25-Hydroxyvitamin D Response to Vitamin D Supplementation: Effects of Genetic Factors, Body Mass Index, and Baseline Concentration. Results from a Randomized Controlled Trial / S. Sollid [et al.] // Horm Metab Res. – 2015. – Vol. 48, iss. 01. – P. 27–34.

27. Response to Antenatal Cholecalciferol Supplementation Is Associated With Common Vitamin D–Related Genetic Variants / R. J. Moon

[et al.] // The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. – 2017. – Vol. 102, iss. 8. – P. 2 941–2 949.

28. An update on vitamin B12-related gene polymorphisms and B12 status / S. Surendran [et al.] // Genes & Nutrition – 2018. – Vol. 13, iss. 2. – P. 1–35.

29. Association of *TCN2* rs1801198 c.776G > C polymorphism with markers of one-carbon metabolism and related diseases: a systematic review and meta-analysis of genetic association studies / A. Oussalah [et al.] // Am J Clin Nutr. – 2017. – Vol. 106, iss. 4. – P. 1 142–1 156.

D. A. Kucheryavaya¹, M. D. Ameliyanovich¹, V. D. Rumyantseva², T. O. Suhan², I. I. Savanovich²,
A. V. Chuprina³, O. E. Polulyah³, T. B. Melik-Kasumov³, P. M. Marozik¹

ANALYSIS OF THE ASSOCIATION OF THE POLYMORPHIC VARIANTS OF VITAMINS METABOLISM GENES WITH VITAMIN D STATUS IN ATHLETES

¹State Scientific Institution

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

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

e-mail: M.Ameliyanovich@igc.by

²State Institution

“Republican Scientific and Practical Center for Sports”

8 Narochanskaya St., 220062 Minsk, the Republic of Belarus

³State Scientific Institution

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

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

Rational nutrition in sports is one of the factors that ensures the effectiveness of the training process, adaptation, performance, recovery and sports achievements. Development of a molecular genetic personification method for the vitamin support of athletes will serve as a basis for a new approach to diet selection taking into account genetic features. In this study, the analysis of the association of molecular genetic markers of vitamin metabolism with a concentration and risk of vitamin D deficiency in the blood of athletes was conducted. The polymorphic variants rs10741657 of the gene *CYP2R1* (OR = 0.41, 95% CI 0.19–0.84, p = 0.01), rs602662 of the gene *FUT2* (OR = 5.26, 95% CI 1.37–30.01, p = 0.008) and rs1801198 of the gene *TCN2* (OR = 0.43, 95% CI 0.21–0.89, p = 0.02) are shown to be associated with a risk of vitamin D deficiency. Moreover, in the carriers of the A/A genotype of the polymorphic variant rs602662, a lower concentration of vitamin D in blood was established compared with A/G and G/G genotype carriers ($\chi^2 = 8.808$, p = 0.012).

Keywords: DNA diagnostics, athletes, vitamin D, vitamin metabolism, nutrigenomics, nutritional status.

Дата поступления в редакцию: 14 февраля 2024 г.

Н. В. Волкова¹, Е. А. Аксёнова², А. А. Яцкив², Н. В. Никитченко², А. В. Солнцева^{3,4},
Р. И. Гончарова²

ВЛИЯНИЕ ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНОВ *CTLA-4* И *PTPN22* У ДЕТЕЙ С САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ 1-го ТИПА НА ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТЬ К АУТОИММУННЫМ ЗАБОЛЕВАНИЯМ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

¹Учреждение здравоохранения

«2-я городская детская клиническая больница»

Республика Беларусь, 220020, г. Минск, ул. Нарочанская, 17

e-mail: volkova_nv@tut.by

²Государственное научное учреждение

«Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси»

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

³Учреждение образования

«Белорусский государственный медицинский университет»

Республика Беларусь, 220083, г. Минск, пр. Дзержинского, 83

⁴Государственное учреждение

«Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии»

Республика Беларусь, 223053, д. Боровляны, ул. Фрунзенская, 43

В работе определены частоты аллелей и генотипов в полиморфных локусах генов *CTLA-4* (rs231775) и *PTPN22* (rs2476601) у детей с аутоиммунным полигландулярным синдромом (АПС) 3а типа (n = 49) и сахарным диабетом (СД) 1-го типа (n = 96). Контрольную группу составили дети без аутоиммунных заболеваний (n = 400 для полиморфизма rs2476601 гена *PTPN22*, 320 — для rs231775 гена *CTLA-4*). Результаты сравнительного анализа распределения генотипов по локусу rs231775 гена *CTLA-4* в исследованных группах позволяют выделить данный полиморфизм как маркер предрасположенности к формированию АПС 3а типа у детей с СД 1-го типа и в здоровой детской популяции. Выявленные различия частоты аллельных вариантов по локусу rs2476601 гена *PTPN22* у пациентов с АПС 3а типа по сравнению с группой контроля указывают на то, что данный локус является генетическим фактором риска АПС 3а типа у здоровых детей в белорусской детской популяции. При этом отсутствие отличий между пациентами с АПС 3а типа и изолированным СД 1-го типа не позволяет считать указанный полиморфизм маркером риска аутоиммунных тиреопатий у детей с СД 1-го типа.

Ключевые слова: аутоиммунные заболевания щитовидной железы, сахарный диабет 1-го типа, аутоиммунный полигландулярный синдром 3а типа, генетический полиморфизм, дети.

Введение

Сахарный диабет (СД) 1-го типа является аутоиммунным заболеванием, которое характеризуется разрушением инсулинпродуцирующих β -клеток поджелудочной железы [1]. В европейских странах отмечается ежегодный рост заболеваемости СД 1-го типа на 3,4%, что приводит к удвоению этого показателя каждые 20 лет [2]. В настоящее время доказано, что наличие СД 1-го типа увеличивает риск других аутоиммунных поражений. Наиболее часто он сочетается с аутоиммунными заболе-

ваниями щитовидной железы (АИЗ ЩЖ), вероятность развития которых в течение жизни у пациентов с СД 1-го типа находится в пределах 15–30%. Наличие аутоиммунно-индуцированных заболеваний по меньшей мере двух эндокринных желез определяется как аутоиммунный полигландулярный синдром (АПС), а сочетание СД 1-го типа и АИЗ ЩЖ классифицируется как АПС 3а типа [1].

Выраженную кластеризацию СД 1-го типа и аутоиммунных тиреопатий в семьях и у отдельных лиц связывают с общими механиз-

мами патогенеза и генетическими факторами этих заболеваний [3]. Ряд генов, которые повышают риск развития АИЗ ЩЖ и СД 1-го типа, обозначают как гены восприимчивости к аутоиммунному АПС 3а типа, предполагая, что их продукты вовлечены в патогенез обоих заболеваний. К ним относятся гены, кодирующие синтез про- и противовоспалительных цитокинов и их рецепторов; белков, участвующих в презентации антигенов; регуляции активации Т- и В-лимфоцитов, Т-регуляторных лимфоцитов: гены ассоциированного с цитотоксическими Т-лимфоцитами антигена 4 (*CTLA-4*), тирозинфосфатазы нерецепторного типа 22 (*PTPN22*), альфа-субъединицы рецептора интерлейкина 2 (*IL2Ra*), фактора некроза опухоли (*TNF*), кластера дифференцировки 40 (*CD40*), неканонических молекул главного комплекса гистосовместимости I класса (*MIC*) [2].

Ген *PTPN22* расположен на хромосоме 1p13.3–p13.1 и кодирует лимфоидную тирозинфосфатазу, преимущественно экспрессируется в лимфоцитах. Данный белок ингибирует активацию Т- и В-клеток посредством удаления фосфатной группы из остатков тирозина в ряде киназ, являющихся промежуточными звеньями сигнального каскада Т- и В-клеточных рецепторов [4].

Впервые о связи между полиморфизмом rs2476601 (с.1858С > Т) гена *PTPN22* и СД 1-го типа сообщил в 2004 г. N. Bottini [5]. В последующем была выявлена ассоциация данного локуса с рядом других аутоиммунных заболеваний: ревматоидным артритом [6], ювенильным ревматоидным артритом [7], системной красной волчанкой [8].

Результаты мета-анализов продемонстрировали связь полиморфизма *PTPN22* с.1858С > Т с восприимчивостью к развитию СД 1-го типа, причем более сильная связь выявлена в европейской и американской популяциях [9]. Данные об ассоциации полиморфизма с.1858С > Т гена *PTPN22* с АПС 3-го типа неоднозначны. В немецкой популяции неоднократно выявлены значительные различия в распределении аллелей и генотипов по данному локусу у взрослых пациентов с АПС 3-го типа по сравнению с одиночными аутоиммунными заболеваниями (СД 1-го типа, болезнью Грейвса, аутоиммунным тиреоидитом) [10, 11]. В Бра-

зилии отмечена связь полиморфного Т-аллеля гена *PTPN22* с наличием положительных антител к тиреоглобулину у пациентов с СД 1-го типа [12]. Однако эти результаты не подтверждены на примере детских популяций в Германии и Бразилии: Т-аллель по локусу rs2476601 гена *PTPN22* у пациентов с СД 1-го типа признан фактором риска развития СД 1-го типа, но связи полиморфизма с сопутствующими АИЗ ЩЖ не обнаружено [13, 14].

CTLA-4 является одной из ключевых молекул, обеспечивающих формирование периферической толерантности. Ген *CTLA-4* расположен на хромосоме 2q33, экспрессируется CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитами, наибольшее значение имеет для работы Т-регуляторных клеток [15].

Полиморфизм rs231775 (с.49А > G) гена *CTLA-4* активно изучают как возможный молекулярно-генетический маркер предрасположенности к СД 1-го типа и АИЗ ЩЖ. Согласно результатам мета-анализов, полиморфизм rs231775 связан с восприимчивостью к СД 1-го типа [16, 17], при этом более сильная ассоциация характерна для азиатов по сравнению с европейской популяцией [17]. По данным ряда работ, проведенных в США [18, 19] и Японии [20, 21], выявлена связь полиморфизма с.49А > G гена *CTLA-4* с АПС 3-го типа, но не с изолированным СД 1-го типа. Напротив, польские исследователи Н. Borysewicz-Sańczyk и соавторы (2020 г.) отметили значительно большую распространенность генотипов GG и AG по локусу с.49А > G гена *CTLA-4* у детей с СД 1-го типа, однако не обнаружили статистических различий по изучаемому полиморфизму между детьми с аутоиммунными тиреоидными заболеваниями и здоровыми сверстниками [22]. В российской популяции была выявлена ассоциация генотипа GG по локусу rs231775 гена *CTLA-4* с СД 1-го типа, однако не обнаружено связи данного полиморфизма с СД 1-го типа в сочетании с АИЗ ЩЖ [23]. В Германии не найдено отличий в распределении аллелей и генотипов по локусу с.49А > G гена *CTLA-4* между пациентами с АПС 3-го типа и изолированным СД 1-го типа и группой контроля [10]. В Беларуси изучалось влияние данного полиморфизма на другие аутоиммунные заболевания, в частности, было показано отсутствие его ассоциации с ювенильным идиопатиче-

ским артритом [24, 25].

Таким образом, данные, касающиеся ассоциации полиморфизмов rs231775 гена *CTLA-4* и rs2476601 гена *PTPN22* с восприимчивостью к АИЗ ЩЖ у пациентов с СД 1-го типа неоднозначны и значительно варьируют в разных популяциях и возрастных группах.

В данной статье представлены результаты сравнительного анализа частот аллелей и генотипов по локусам rs231775 гена *CTLA-4* и rs2476601 гена *PTPN22* и их парных сочетаний в группах детей с АПС 3а типа и СД 1-го типа между собой и в сравнении с контрольной группой детей без аутоиммунной патологии в белорусской популяции.

Материалы и методы

Для проведения поперечного исследования «случай-контроль» на базе УЗ «2-я городская детская клиническая больница» г. Минска были сформированы две группы пациентов: 49 детей с аутоиммунным полигландулярным синдромом 3а типа (сочетание СД 1-го типа и аутоиммунного тиреоидита ($n = 47$) или болезни Грейвса ($n = 2$)) — основная группа; и 96 детей с изолированным СД 1-го типа — группа сравнения. В основную группу включены 32 девочки и 17 мальчиков, возраст 12,3 (10,4–15,6) лет; в группу сравнения — 41 девочка и 55 мальчиков, возраст 11,6 (9,3–14,3) лет. Контрольную группу составили условно здоровые дети в возрасте от 5 до 17 лет, не имеющие аутоиммунных и хронических воспалительных заболеваний: $n = 400$ для полиморфизма rs2476601 гена *PTPN22* (171 девочка и 229 мальчиков, возраст 15,0 (13,0–16,0) лет) и 320 — для rs231775 гена *CTLA-4* (138 девочек и 182 мальчика, возраст 15,0 (13,0–16,0) лет); у 281 ребенка (120 девочек и 161 мальчика) проведено генотипирование по обоим локусам. Сбор биологического материала осуществляли после получения письменного информированного согласия и одобрения проведения исследований этическим комитетом. Материалом исследования являлась геномная ДНК, выделенная из сухих пятен нативной венозной крови, нанесенных на фильтровальную бумагу, или из цельной венозной крови (для контрольной группы) методом фенол-хлороформной экстракции. Молекулярно-генетическое исследование выполнено на

базе ГНУ «Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси». Для генотипирования однонуклеотидных полиморфизмов rs231775 гена *CTLA-4* и rs2476601 гена *PTPN22* применена методика ПЦР в реальном времени с использованием специфических праймеров и флуоресцентно меченых зондов на амплификаторе C1000 Touch, Bio-Rad. По окончании ПЦР проводили анализ результатов с помощью программного обеспечения BioRad CFXManager™.

Анализ результатов исследования проводили с использованием MS EXCEL и статистического пакета STATSOFT STATISTICA 10.0 для Windows. Для оценки соответствия распределения генотипов равновесию Харди-Вайнберга использовали критерий χ^2 Пирсона.

Для сравнительного анализа распределения частот аллелей генотипов в группах пациентов вычисляли χ^2 , а для количественной оценки ассоциации использовали показатель отношения шансов (ОШ) и рассчитывали 95%-ый доверительный интервал (95% ДИ). Различия считались значимыми при уровне $p < 0,05$.

Для оценки межгенных взаимодействий и поиска наиболее информативных предсказательных комбинаций генотипов был использован непараметрический метод многофакторного сокращения размерности. Анализ проводили в программе открытого доступа MDR 3.0.2.

Результаты и обсуждение

Распределение частот генотипов по полиморфным локусам в группах детей с аутоиммунной патологией и контрольных группах соответствовало закону Харди-Вайнберга.

При сравнении частот генотипов полиморфных вариантов rs231775 гена *CTLA-4* в основной группе и группе сравнения отмечено преобладание носительства генотипов с аллелем G у детей с АПС 3а типа по сравнению со сверстниками с изолированным СД 1-го типа в аддитивной и доминантной моделях наследования. Выявлено повышение вероятности формирования АПС 3-го типа при носительстве генотипов AG/GG в 3,62 раза (95% ДИ 1,06–7,22, $p = 0,010$) по сравнению с изолированным СД 1-го типа. Отмечена слабая ассоциация аллеля G с сопутствующими аутоиммунными тиреопатиями у детей с СД 1-го

типа (1,64 [1,01–2,69], $p = 0,048$) (табл. 1).

В результате сравнения частот полиморфизма rs231775 гена *CTLA-4* в исследуемых группах с контрольной выборкой выявлено статистически значимое различие частоты аллелей и генотипов между пациентами с АПС 3а типа и здоровыми сверстниками в аддитивной, доминантной и мультипликативной моделях наследования. В то же время оценка роли полиморфизма rs231775 (*CTLA-4*) в формировании предрасположенности к изолированному СД 1-го типа не показала ассоциации

с заболеванием (табл. 1).

В белорусской популяции впервые из европейских стран показана связь полиморфного варианта в локусе rs231775 гена *CTLA-4* с повышенным риском сочетанного развития СД 1-го типа и АИЗ ЩЖ у детей. Полученные данные согласуются с результатами работ, проведенных в США [18, 19] и Японии [20, 21], что позволяет рассматривать указанный локус как маркер предрасположенности к аутоиммунным тиреопатиям у детей с СД 1-го типа и риска развития АПС 3а типа у здоровых детей.

Таблица 1

Распределение частот генотипов и аллелей по локусу 49A > G (rs231775) гена *CTLA-4* у пациентов обоих полов с АПС 3а типа, СД 1-го типа и детей без аутоиммунных заболеваний

Генотипы/ аллели	Частота встречаемости, n (%)			P*	ОШ* (95% ДИ)	P**	ОШ** (95% ДИ)	P***	ОШ*** (95% ДИ)
	АПС 3а типа	СД 1-го типа	Контроль						
Аддитивная модель									
AA	5 (10,2)	28 (29,2)	97 (30,3)	0,036	0,28 [0,10–0,77]	0,011	0,26 [0,10–0,68]	0,665	0,95 [0,57–1,56]
AG	30 (61,2)	46 (47,9)	163 (50,9)		3,65 [1,27–10,51]		3,57 [1,34–9,51]		0,98 [0,57–1,67]
GG	14 (28,6)	22 (22,9)	60 (18,8)		3,56 [1,11–11,42]		4,55 [1,55–13,21]		1,27 [0,67–2,42]
Доминантная модель									
GG/AG	44 (89,8)	68 (70,8)	223 (69,7)	0,010	3,62 [1,30–10,09]	0,003	3,83 [1,47–9,95]	0,830	1,06 [0,64–1,74]
AA	5 (10,2)	28 (29,2)	97 (30,3)		0,28 [0,10–0,77]		0,26 [0,10–0,68]		0,95 [0,57–1,56]
Мультипликативная модель									
A	40 (40,8)	102 (53,1)	357 (55,8)	0,048	0,61 [0,37–0,99]	0,006	0,55 [0,35–0,84]	0,517	0,89 [0,65–1,24]
G	58 (59,2)	90 (46,9)	283 (44,2)		1,64 [1,01–2,69]		1,83 [1,19–2,82]		1,11 [0,81–1,54]

Примечание. * — АПС 3а типа vs СД 1-го типа; ** — АПС 3а типа vs контроль; *** — СД 1-го типа vs контроль

После разделения пациентов по полу отмечена значимая разница в распределении аллелей и генотипов по локусу rs231775 гена *CTLA-4* между девочками с АПС 3-го типа и группой контроля в доминантной и мультипликативной моделях наследования. В то же время отличия между пациентками с АПС 3-го типа и СД 1-го типа были статистически незначимы (табл. 2).

Среди мальчиков выявлена ассоциация

полиморфизма rs231775 гена *CTLA-4* с сопутствующими АИЗ ЩЖ у пациентов с СД 1-го типа в доминантной модели наследования (AG/GG vs AA: ОШ 8,44 [1,04–68,64], $p = 0,022$) и тенденция к более высокой частоте генотипов AG/GG у пациентов с АПС 3-го типа по сравнению с группой контроля ($p = 0,067$) (табл. 3).

При анализе распределения аллелей и генотипов по локусу rs2476601 гена *PTPN22*

Таблица 2

Распределение частот генотипов и аллелей по локусу 49A > G (rs231775) гена *CTLA-4* у девочек с АПС 3а типа, СД 1-го типа и без аутоиммунных заболеваний

Генотипы/ аллели	Частота встречаемости, n (%)			P*	ОШ* (95% ДИ)	P**	ОШ** (95% ДИ)	P***	ОШ*** (95% ДИ)
	АПС 3а типа	СД 1-го типа	Контроль						
Аддитивная модель									
AA	4 (12,5)	9 (21,9)	43 (31,2)	0,576	0,28 [0,10–0,77]	0,077	0,26 [0,10–0,68]	0,413	0,95 [0,57–1,56]
AG	19 (59,4)	22 (53,7)	71 (51,4)		1,94 [0,51–7,33]		2,88 [0,92–9,02]		1,48 [0,62–3,51]
GG	9 (28,1)	10 (24,4)	24 (17,4)		2,03 [0,46–8,92]		4,03 [1,12–14,49]		1,99 [0,71–5,57]
Доминантная модель									
GG/AG	28 (87,5)	32 (78,1)	95 (68,8)	0,298	1,97 [0,55–7,10]	0,034	3,17 [1,05–9,59]	0,256	1,61 [0,71–3,66]
AA	4 (12,5)	9 (21,9)	43 (31,2)		0,51 [0,14–1,83]		0,32 [0,10–0,96]		0,62 [0,27–1,41]
Мультипликативная модель									
A	27 (42,2)	40 (48,8)	157 (56,9)	0,429	0,77 [0,40–1,48]	0,034	0,55 [0,32–0,96]	0,196	0,72 [0,44–1,18]
G	37 (57,8)	42 (51,2)	119 (43,1)		1,31 [0,68–2,52]		1,81 [1,04–3,13]		1,39 [0,85–2,27]

Примечание. * — АПС 3а типа vs СД 1-го типа; ** — АПС 3а типа vs контроль; *** — СД 1-го типа vs контроль

Таблица 3

Распределение частот генотипов и аллелей по локусу 49A > G (rs231775) гена *CTLA-4* у мальчиков с АПС 3а типа, СД 1-го типа и без аутоиммунных заболеваний

Генотипы/ аллели	Частота встречаемости, n (%)			P*	ОШ* (95% ДИ)	P**	ОШ** (95% ДИ)	P***	ОШ*** (95% ДИ)
	АПС 3а типа	СД 1-го типа	Контроль						
Аддитивная модель									
AA	1 (5,9)	19 (34,5)	54 (29,7)	0,069	0,12 [0,01–0,96]	0,106	0,15 [0,02–1,15]	0,662	1,25 [0,66–2,37]
AG	11 (64,7)	24 (43,6)	92 (50,5)		8,71 [1,03–73,56]		6,46 [0,81–51,40]		0,74 [0,37–1,48]
GG	5 (29,4)	12 (21,8)	36 (19,8)		7,92 [0,82–76,28]		7,50 [0,84–66,89]		0,95 [0,41–2,18]
Доминантная модель									
GG/AG	16 (94,1)	36 (65,5)	128 (70,3)	0,022	8,44 [1,04–68,64]	0,067	6,75 [0,87–52,18]	0,494	0,80 [0,42–1,52]
AA	1 (5,9)	19 (34,5)	54 (29,7)		0,12 [0,01–0,96]		0,15 [0,02–1,15]		1,25 [0,66–2,37]

Окончание таблицы 3

Генотипы/ аллели	Частота встречаемости, n (%)			P*	ОШ* (95% ДИ)	P**	ОШ** (95% ДИ)	P***	ОШ*** (95% ДИ)
	АПС 3а типа	СД 1-го типа	Контроль						
Мультипликативная модель									
A	13 (38,2)	62 (56,4)	200 (54,9)	0,065	0,48 [0,22–1,05]	0,062	0,51 [0,25–1,04]	0,793	1,06 [0,69–1,63]
G	21 (61,8)	48 (43,6)	164 (45,1)		2,09 [0,95–4,59]		1,97 [0,96–4,05]		0,94 [0,61–1,45]

Примечание. * — АПС 3а типа vs СД 1-го типа; ** — АПС 3а типа vs контроль; *** — СД 1-го типа vs контроль

в основной группе и группе сравнения не обнаружено статистически значимых различий между детьми с АПС 3а типа и изолированным СД 1-го типа (табл. 4). Сравнение результатов генотипирования по данному локусу в исследуемых группах с группой контроля показало наличие ассоциации минорного аллеля Т и генотипов ТТ/СТ, с повышенным риском развития АПС 3-го типа (Т: ОШ 1,72 [1,03–2,88], $p = 0,036$; ТТ/СТ vs СС: ОШ 1,94 [1,05–3,57],

$p = 0,032$). Различия между пациентами с изолированным СД 1-го типа и группой контроля не достигли статистической значимости.

Таким образом, полиморфизм rs2476601 гена *PTPN22* можно рассматривать как маркер риска АПС 3а типа у здоровых детей, но не развития аутоиммунных тиреопатий у детей с СД 1-го типа.

В результате разделения исследуемых групп по полу отмечена тенденция к более высо-

Таблица 4

Распределение частот генотипов и аллелей по локусу с.1858С > Т (rs2476601) гена *PTPN22* у пациентов с АПС 3а типа, СД 1-го типа и детей без аутоиммунных заболеваний

Генотипы/ аллели	Частота встречаемости, n (%)			P*	ОШ* (95% ДИ)	P**	ОШ** (95% ДИ)	P***	ОШ*** (95% ДИ)
	АПС 3а типа	СД 1-го типа	Контроль						
Аддитивная модель									
СС	29 (59,2)	64 (66,7)	295 (73,8)	0,647	0,73 [0,36–1,48]	0,099	0,51 [0,28–0,95]	0,331	0,71 [0,44–1,15]
СТ	18 (36,7)	28 (29,2)	95 (23,8)		1,42 [0,68–2,96]		1,93 [1,02–3,63]		1,36 [0,82–2,24]
ТТ	2 (4,1)	4 (4,2)	10 (2,5)		1,10 [0,19–6,37]		2,02 [0,43–9,73]		1,84 [0,56–6,06]
Доминантная модель									
СС	29 (59,2)	64 (66,7)	295 (73,8)	0,376	0,73 [0,36–1,48]	0,032	0,51 [0,28–0,95]	0,164	0,71 [0,44–1,15]
ТТ/СТ	20 (40,8)	32 (33,3)	105 (26,2)		1,38 [0,68–2,81]		1,94 [1,05–3,57]		1,40 [0,87–2,27]
Мультипликативная модель									
С	76 (77,6)	156 (81,2)	685 (85,6)	0,457	0,80 [0,44–1,45]	0,036	0,58 [0,35–0,97]	0,130	0,73 [0,48–1,10]
Т	22 (22,4)	36 (18,8)	115 (14,4)		1,25 [0,69–2,28]		1,72 [1,03–2,88]		1,37 [0,91–2,08]

Примечание. * — АПС 3а типа vs СД 1-го типа; ** — АПС 3а типа vs контроль; *** — СД 1-го типа vs контроль

кой распространенности генотипов ТТ/СТ ($p = 0,066$) и аллеля Т ($p = 0,078$) у девочек с АПС 3-го типа по сравнению с группой контроля. Разница между пациентками с АПС

3-го типа и СД 1-го типа не была статистически значимой (табл. 5).

Сравнение частот rs2476601 гена *PTPN22* у мальчиков с АПС 3-го типа со сверстниками

Таблица 5

Распределение частот генотипов и аллелей по локусу $c.1858C > T$ (rs2476601) гена *PTPN22* у девочек с АПС 3а типа, СД 1-го типа и без аутоиммунных заболеваний

Генотипы/ аллели	Частота встречаемости, n (%)			P*	ОШ* (95% ДИ)	P**	ОШ** (95% ДИ)	P***	ОШ*** (95% ДИ)
	АПС 3а типа	СД 1-го типа	Контроль						
Аддитивная модель									
СС	18 (56,3)	30 (73,2)	124 (72,5)	0,314	0,47 [0,18–1,26]	0,182	0,49 [0,22–1,06]	0,948	1,03 [0,48–2,23]
СТ	13 (40,6)	10 (24,4)	44 (25,7)		2,17 [0,79–5,95]		2,04 [0,92–4,49]		0,94 [0,42–2,08]
ТТ	1 (3,1)	1 (2,4)	3 (1,8)		1,67 [0,10–28,32]		2,30 [0,23–23,29]		1,34 [0,14–13,72]
Доминантная модель									
СС	18 (56,3)	30 (73,2)	124 (72,5)	0,133	0,47 [0,18–1,26]	0,066	0,49 [0,22–1,06]	0,933	1,03 [0,48–2,23]
ТТ/СТ	14 (43,7)	11 (26,8)	47 (27,5)		2,12 [0,79–5,67]		2,05 [0,95–4,45]		0,97 [0,45–2,09]
Мультипликативная модель									
С	49 (76,6)	70 (85,4)	292 (85,4)	0,176	0,56 [0,24–1,30]	0,078	0,56 [0,29–1,07]	0,997	1,00 [0,51–1,98]
Т	15 (23,4)	12 (14,6)	50 (14,6)		1,79 [0,77–4,15]		1,79 [0,93–3,43]		1,00 [0,51–1,98]

Примечание. * — АПС 3а типа vs СД 1-го типа; ** — АПС 3а типа vs контроль; *** — СД 1-го типа vs контроль

с СД 1-го типа и группой контроля не показало статистически значимой разницы. Отмечена слабая ассоциация минорного аллеля Т с изолированным СД 1-го типа (Т: ОШ 1,69 [1,00–2,85], $p = 0,048$) (табл. 6).

Исходя из гипотезы об усилении эффектов однонуклеотидных полиморфизмов на риск возникновения заболевания при их совместном воздействии, был проведен сравнительный анализ двухлокусных генотипов по локусам rs231775 гена *CTLA-4* и rs2476601 гена *PTPN22* в исследуемых группах. В таблице 7 показаны данные для комбинаций генотипов, по которым обнаружено наличие статистически значимой разницы между группами.

Установлено, что гетерозиготное состояние по обоим полиморфным локусам (*CTLA-4*_{AG}/*PTPN22*_{CT}) связано с повышенной вероятностью

развития АИЗ ШЖ у детей с СД 1-го типа (ОШ 2,53 [1,05–6,07]) и АПС 3-го типа у здоровых детей (ОШ 2,18 [1,06–4,46]). Отмечена значительно большая частота комбинаций генотипов, содержащих хотя бы один минорный аллель по каждому из двух изучаемых полиморфизмов (*CTLA4*_{AG+GG}/*PTPN22*_{CT+TT}), у детей с АПС 3а типа по сравнению с группой сравнения (ОШ 2,46 [1,17–5,20]) и контролем (ОШ 2,71 [1,43–5,14]). При этом после стратификации пациентов по полу данные ассоциации выявлены только у девочек.

Показан защитный эффект гомозиготного носительства мажорных аллелей по обоим локусам (*CTLA-4*_{AA}/*PTPN22*_{CC}) в отношении АПС 3а типа у здоровых детей (ОШ 0,37 [0,14–0,97]), частота данной комбинации у пациентов разных полов была сопоставима (табл. 7).

Таблица 6

Распределение частот генотипов и аллелей по локусу с.1858С>Т (rs2476601) гена *PTPN22* у мальчиков с АПС 3а типа, СД 1 типа и без аутоиммунных заболеваний

Генотипы/ аллели	Частота встречаемости, n (%)			P*	ОШ* (95% ДИ)	P**	ОШ** (95% ДИ)	P***	ОШ*** (95% ДИ)
	АПС 3а типа	СД 1-го типа	Контроль						
Аддитивная модель									
СС	11 (64,7)	34 (61,8)	171 (74,7)	0,967	1,13 [0,36–3,51]	0,620	0,62 [0,22–1,76]	0,155	0,55 [0,30–1,02]
СТ	5 (29,4)	18 (32,7)	51 (22,3)		0,86 [0,26–2,86]		1,52 [0,51–4,59]		1,78 [0,93–3,40]
ТТ	1 (5,9)	3 (5,5)	7 (3,1)		1,03 [0,10–10,95]		2,22 [0,25–19,69]		2,16 [0,53–8,76]
Доминантная модель									
СС	11 (64,7)	34 (61,8)	171 (74,7)	0,831	1,13 [0,36–3,51]	0,367	0,62 [0,22–1,76]	0,057	0,55 [0,30–1,02]
ТТ/СТ	6 (35,3)	21 (38,2)	58 (25,3)		0,88 [0,28–2,74]		1,61 [0,57–4,54]		1,82 [0,98–3,39]
Мультипликативная модель									
С	27 (79,4)	86 (78,2)	393 (85,8)	0,879	1,08 [0,42–2,77]	0,309	0,64 [0,27–1,53]	0,048	0,59 [0,35–1,00]
Т	7 (20,6)	24 (21,8)	65 (14,2)		0,93 [0,36–2,39]		1,57 [0,66–3,75]		1,69 [1,00–2,85]

Примечание. * — АПС 3а типа vs СД 1-го типа; ** — АПС 3а типа vs контроль; *** — СД 1-го типа vs контроль

Таблица 7

Влияние комбинированных генотипов по локусам генов *CTLA-4* и *PTPN22* на предрасположенность к аутоиммунным тиреопатиям у детей с СД 1-го типа и АПС 3-го типа и СД 1-го типа у здоровых детей

Комбинации генотипов	<i>CTLA4</i> _{AG} / <i>PTPN22</i> _{CT}	<i>CTLA4</i> _{AA} / <i>PTPN22</i> _{CC}	<i>CTLA-4</i> _{AG+GG} / <i>PTPN22</i> _{CT+TT}
Общая группа			
АПС 3-го типа, n (%)	13 (26,5)	5 (10,2)	20 (40,8)
СД 1-го типа, n (%)	12 (12,5)	17 (17,7)	21 (21,9)
Контроль, n (%)	40 (14,3)	66 (23,5)	57 (20,3)
ОШ*	2,53 [1,05–6,07]	0,53 [0,18–1,53]	2,46 [1,17–5,20]
p*	0,035	0,235	0,017
ОШ**	2,18 [1,06–4,46]	0,37 [0,14–0,97]	2,71 [1,43–5,14]
p**	0,031	0,037	0,002
ОШ***	0,86 [0,43–1,72]	0,70 [0,39–1,27]	1,10 [0,63–1,94]
p***	0,671	0,239	0,740
Девочки			
АПС 3-го типа, n (%)	11 (34,4)	4 (12,5)	14 (43,8)
СД 1-го типа, n (%)	3 (7,3)	5 (12,2)	7 (17,1)
Контроль, n (%)	17 (14,2)	28 (23,3)	25 (20,8)
ОШ*	6,63 [1,66–26,46]	1,03 [0,25–4,19]	3,78 [1,29–11,04]

Окончание таблицы 7

Комбинации генотипов	<i>CTLA4</i> _{AG} / <i>PTPN22</i> _{CT}	<i>CTLA4</i> _{AA} / <i>PTPN22</i> _{CC}	<i>CTLA-4</i> _{AG+GG} / <i>PTPN22</i> _{CT+TT}
p*	0,004	0,969	0,013
ОШ**	3,17 [1,30–7,74]	0,47 [0,16–1,45]	2,96 [1,29–6,75]
p**	0,009	0,183	0,009
ОШ***	0,48 [0,13–1,72]	0,46 [0,16–1,27]	0,78 [0,31–1,97]
p***	0,253	0,128	0,604
Мальчики			
АПС 3-го типа, n (%)	2 (11,8)	1 (5,9)	6 (35,3)
СД 1-го типа, n (%)	9 (16,4)	12 (21,8)	14 (25,5)
Контроль, n (%)	23 (14,3)	38 (23,6)	32 (19,9)
ОШ*	0,68 [0,13–3,51]	0,22 [0,03–1,86]	1,60 [0,50–5,12]
p*	0,647	0,138	0,432
ОШ**	0,80 [0,17–3,73]	0,20 [0,03–1,58]	2,20 [0,76–6,39]
p**	0,777	0,094	0,141
ОШ***	1,17 [0,51–2,72]	0,90 [0,43–1,89]	1,38 [0,67–2,83]
p***	0,709	0,787	0,384

Примечание. * — АПС 3а типа vs СД 1-го типа; ** — АПС 3а типа vs контроль; *** — СД 1-го типа vs контроль

По результатам анализа межгенного взаимодействия у детей с АПС 3а типа и СД 1-го типа выявлено синергическое взаимодействие комбинации полиморфизмов rs231775 (*CTLA-4*) и 2476601 (*PTPN22*) — их общий вклад в вероятность развития АИЗ ЩЖ у детей с СД 1-го типа составил 1,78%. При этом синергизм изучаемых полиморфизмов обнаружен только у девочек (величина энтропии 6,30%), что подтверждает данные анализа комбинированных генотипов, показавшие их статистическую значимость как факторов риска развития

АИЗ ЩЖ у пациенток с СД 1-го типа. В то же время у мальчиков отмечен дублирующий эффект между локусами (табл. 8).

При оценке вклада каждого локуса в формирование АИЗ ЩЖ у детей разного пола с СД 1-го типа выявлено преобладание rs2476601 (*PTPN22*) у девочек (2,28%) и rs231775 (*CTLA-4*) — у мальчиков (6,60%) (табл. 8).

В литературе есть данные, свидетельствующие о специфичной для женского пола ассоциации между полиморфизмом rs2476601 гена *PTPN22* и риском ряда аутоиммунных

Таблица 8

Величины энтропии для полиморфных вариантов rs231775 (*CTLA-4*) и 2476601 (*PTPN22*) у детей с АПС 3-го типа с СД 1-го типа

Полиморфизмы	Общая группа, %	Девочки, %	Мальчики, %
АПС 3-го типа–СД 1-го типа			
rs231775 (<i>CTLA-4</i>)	3,66	1,12	6,60
rs2476601 (<i>PTPN22</i>)	0,43	2,28	0,07
Комбинация rs231775 (<i>CTLA-4</i>) и rs2476601 (<i>PTPN22</i>)	1,78	6,30	–0,71
АПС 3-го типа–контроль			
rs231775 (<i>CTLA-4</i>)	2,07	2,53	2,06
rs2476601 (<i>PTPN22</i>)	0,95	1,46	0,40
Комбинация rs231775 (<i>CTLA-4</i>) и rs2476601 (<i>PTPN22</i>)	–0,80	1,62	0,66

Окончание таблицы 8

Полиморфизмы	Общая группа, %	Девочки, %	Мальчики, %
СД 1-го типа–контроль			
rs231775 (<i>CTLA-4</i>)	0,13	0,73	0,38
rs2476601 (<i>PTPN22</i>)	0,45	0,30	1,29
Комбинация rs231775 (<i>CTLA-4</i>) и rs2476601 (<i>PTPN22</i>)	0,62	0,10	0,46

заболеваний: ювенильного ревматоидного артрита [26], тиреоидита Хашимото у женщин с СД 2-го типа [27], болезни Грейвса и аутоиммунного тиреоидита у девочек [28]. Количество исследований, в которых при анализе ассоциации полиморфизма rs231775 (*CTLA-4*) с аутоиммунными заболеваниями была проведена стратификация исследуемых групп по полу, невелико. В частности, W. H. Ting с соавторами установили статистически значимую ассоциацию rs231775 (*CTLA-4*) с АИЗ ЩЖ в китайской популяции только у женщин [29].

Значительно более высокая распространенность большинства аутоиммунных заболеваний у женского пола является доказанным феноменом [30]. Наши данные дают возможность подробно проанализировать гендерные особенности генетической предрасположенности к АПС 3а типа на примере двух генов.

Так, по результатам сравнительной оценки частот аллелей и генотипов в исследуемых группах по каждому из двух полиморфных локусов установлено, что полиморфизм rs231775 гена *CTLA-4* является маркером риска развития АПС 3-го типа у здоровых девочек и аутоиммунных тиреопатий у мальчиков с СД 1-го типа. В то же время не выявлено ассоциации данного локуса с вероятностью возникновения АИЗ ЩЖ у девочек с СД 1-го типа. Таким образом, на данном этапе анализа убедительных доказательств в пользу большей подверженности АПС 3-го типа у девочек не получено.

В связи с полигенной природой аутоиммунных заболеваний и возможности проявления кумулятивного эффекта у сочетаний генов, исследование комбинаций полиморфизмов дает более полную картину о генетической предрасположенности к аутоиммунным поражениям. Мы установили наличие ассоциации гетерозиготного носительства минорных аллелей по обоим полиморфизмам и комбинаций генотипов, содержащих один либо два

минорных аллеля по каждому локусу, с повышенной вероятностью развития аутоиммунных тиреопатий у детей с СД 1-го типа и АПС 3-го типа у здоровых детей. При разделении пациентов по полу данное положение подтвердилось только у девочек, причем значения отношения шансов у них были выше, чем в общей выборке.

Результаты анализа межгенного взаимодействия показали синергизм полиморфизмов rs231775 (*CTLA-4*) и 2476601 (*PTPN22*) в отношении риска развития аутоиммунной тиреодной патологии у детей с СД 1-го типа. После стратификации пациентов по полу синергетическое взаимодействие генов выявлено только у девочек, при этом величина энтропии для пары локусов у них значительно превышала показатель в общей группе.

На основании полученных данных можно предполагать, что девочки подвержены более высокому риску сочетанного развитию СД 1-го типа и аутоиммунных тиреопатий. Это согласуется с распределением полов в нашей выборке детей с АПС 3а типа: 32 (65,3%) девочки против 17 (34,7%) мальчиков ($p = 0,003$).

Заключение

Установлены значимые отличия по частотам распространенности аллельных вариантов в локусе rs231775 гена *CTLA-4* между детьми с АПС 3а типа и изолированным СД 1-го типа, а также между пациентами с АПС 3а типа и группой контроля; при этом отсутствовали различия между пациентами с СД 1-го типа и здоровыми сверстниками. Полученные результаты позволяют выделить данный полиморфизм как маркер предрасположенности к развитию АИЗ ЩЖ у детей с СД 1-го типа и АПС 3а типа у здоровых детей в белорусской популяции.

Выявленные различия распределения аллелей и генотипов по локусу rs2476601 гена

PTPN22 у пациентов с АПС 3а типа по сравнению с группой контроля указывают на то, что данный полиморфизм является генетическим фактором предрасположенности к АПС 3а типа у здоровых детей. Отсутствие значимых отличий между пациентами с АПС 3а типа и изолированным СД 1-го типа не позволяет считать данный полиморфизм маркером повышенного риска развития аутоиммунных тиреоидных заболеваний у детей с СД 1-го типа.

Отмечены гендерные особенности ассоциации полиморфных вариантов исследуемых генов с предрасположенностью к аутоиммунным эндокринопатиям. У мальчиков установлена связь минорного аллеля T rs2476601 гена *PTPN22* с изолированным СД 1-го типа, а полиморфизм rs231775 (*CTLA-4*) можно рассматривать как основной маркер риска развития сопутствующих АИЗ ЩЖ, что подтверждается наиболее высоким вкладом данного локуса в развитие заболеваний при анализе межгенных взаимодействий. У девочек выявлено синергическое взаимодействие полиморфизмов rs231775 (*CTLA-4*) и 2476601 (*PTPN22*), фактором риска АИЗ ЩЖ у пациенток с СД 1-го типа и АПС 3-го типа у здоровых девочек является носительство минорных аллелей по каждому из локусов. В то же время у девочек полиморфизм rs231775 (*CTLA-4*) является самостоятельным фактором риска возникновения АПС 3-го типа в здоровой популяции.

Авторы выражают благодарность сотрудникам лабораторий нехромосомной наследственности и молекулярных основ стабильности генома Института генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси, принявшим участие в исследовании. Работа выполнена по договору № 2018-28-006 от 23.03.2018 на выполнение НИОК(Т)Р вне рамок государственных программ, государственных (отраслевых) научно-технических программ за счет средств республиканского централизованного инновационного фонда.

Список использованных источников

1. Frommer, L. Type 1 Diabetes and Autoimmune Thyroid Disease-The Genetic Link / L. Frommer, G. J. Kahaly // *Front Endocrinol (Lausanne)*. – 2021. – Vol. 12. – DOI: 10.3389/fendo.2021.618213
2. Trends and cyclical variation in the incidence of childhood type 1 diabetes in 26 European centres in the 25 year period 1989–2013: a multicentre prospective registration study / C. C. Patterson [et al.] // *Diabetologia*. – 2019. – Vol. 62, № 3. – P. 408–417.
3. Li, L. Autoimmune thyroid disease and type 1 diabetes mellitus: same pathogenesis; new perspective? / L. Li, S. Liu, J. Yu // *Ther Adv Endocrinol Metab*. – 2020. – Vol. 11. – DOI: 10.1177/2042018820958329
4. Armitage, L. H. Influence of *PTPN22* Allotypes on Innate and Adaptive Immune Function in Health and Disease / L. H. Armitage, M. A. Wallet, C. E. Mathew // *Front Immunol*. – 2021. – Vol. 12. – DOI: 10.3389/fimmu.2021.636618
5. A functional variant of lymphoid tyrosine phosphatase is associated with type I diabetes / N. Bottini [et al.] // *Nat. Genet*. – 2004. – Vol. 36. – P. 337–338.
6. Epidemiological Investigation of Rheumatoid Arthritis (EIRA) Study Group A genome-wide association study suggests contrasting associations in ACPA-positive versus ACPA-negative rheumatoid arthritis / L. Padyukov [et al.] // *Ann. Rheum. Dis*. – 2011. – Vol. 70. – P. 259–265.
7. Association of *PTPN22* 1858C/T Polymorphism with Autoimmune Diseases: A Systematic Review and Bayesian Approach / K. Tizaoui [et al.] // *J. Clin. Med*. – 2019. – Vol. 8. – DOI: 10.3390/jcm8030347
8. *PTPN22* 1858C > T gene polymorphism in patients with SLE: Association with serological and clinical results / L. Ostanek [et al.] // *Molecular Biology Reports*. – 2014. – Vol. 41, № 9. – P. 6 195–6 200.
9. Association of *PTPN22* C1858T polymorphism and type 1 diabetes: a meta-analysis / H. Peng [et al.] // *Immunol Invest* // 2012. – Vol. 41, № 5. – P. 484–96.
10. *PTPN22* and *CTLA-4* Polymorphisms Are Associated With Polyglandular Autoimmunity / J. Houcken [et al.] // *J Clin Endocrinol Metab*. – 2018. – Vol. 103, № 5. – P. 1 977–1 984.
11. The protein tyrosine phosphatase non-receptor type 22 C1858T polymorphism is a joint susceptibility locus for immunthyroiditis and autoimmune diabetes / G. Dultz [et al.] // *Thyroid*. – 2009. – Vol. 19, № 2. – P. 143–148.
12. The *PTPN22* 1858T allele but not variants

- in the proximal promoter region of *IL-21* gene is associated with the susceptibility to type 1 diabetes and the presence of autoantibodies in a Brazilian cohort / D. T. Mainardi-Novo [et al.] // *Clin Exp Immunol.* – 2013. – Vol. 172, № 1. – P. 16–22.
13. *PTPN22* 1858T allele is associated with younger age at onset of type 1 diabetes and is not related to subsequent thyroid autoimmunity / O. Kordonouri [et al.] // *Hum Immunol.* – 2010. – Vol. 71, № 7. – P. 731–732.
14. Association of *TNF- α* , *CTLA4*, and *PTPN22* polymorphisms with type 1 diabetes and other autoimmune diseases in Brazil // N. A. Tavares [et al.] // *Genet Mol Res.* – 2015. – Vol. 14, № 4. – DOI: 10.4238/2015.December.28.42
15. *CTLA-4*: From mechanism to autoimmune therapy. *Int Immunopharmacol* / A. Hosseini [et al.] // 2020. – Vol. 80. – DOI: 10.1016/j.intimp.2020.106221
16. Chen, M. Associations between cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4 gene polymorphisms and diabetes mellitus: a meta-analysis of 76 case-control studies / M. Chen, S. Li // *Biosci Rep.* – 2019. – Vol. 38. – DOI: 10.1042/BSR20190309
17. Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4 +49A/G polymorphisms contribute to the risk of type 1 diabetes in children: An updated systematic review and meta-analysis with trial sequential analysis / B. Wang [et al.] // *Oncotarget.* – 2017. – Vol. 8. – P. 10 553–10 564.
18. Autoimmune thyroiditis and diabetes: dissecting the joint genetic susceptibility in a large cohort of multiplex families / M. J. Villano [et al.] // *J Clin Endocrinol Metab.* – 2009. – Vol. 94. – P. 1 458–1 466.
19. Genetic analysis of families with autoimmune diabetes and thyroiditis: evidence for common and unique genes / B. Golden [et al.] // *J Clin Endocrinol Metab.* – 2005. – Vol. 90, № 8. – P. 4 904–4 911.
20. Association of *CTLA-4* gene A/G polymorphism in Japanese type 1 diabetic patients with younger age of onset and autoimmune thyroid disease / M. Takara [et al.] // *Diabetes Care.* – 2000. – Vol. 23, № 7. – P. 975–978.
21. Association of the *CTLA-4* gene 49 A/G polymorphism with type 1 diabetes and autoimmune thyroid disease in Japanese children / M. Mochizuki [et al.] // *Diabetes Care.* – 2003. – Vol. 26. – P. 843–847.
22. Genetic Association Study of *IL2RA*, *IFIH1*, and *CTLA-4* Polymorphisms With Autoimmune Thyroid Diseases and Type 1 Diabetes / H. Borysewicz-Sańczyk [et al.] // *Front Pediatr.* – 2020. – Vol. 8. – DOI: 10.3389/fped.2020.00481
23. Особенности распределения частот аллелей и генотипов полиморфизмов rs 231775 и rs 3087243 гена *CTLA-4* с оценкой их взаимовлияния у пациентов с сахарным диабетом 1 типа и сахарным диабетом 1 типа в сочетании с аутоиммунными тиреопатиями / Е. А. Репина [и др.] // *Евразийский Союз Ученых.* – 2015. – Т. 4, № 13. – С 163–166.
24. Полиморфизм генов иммунного и воспалительного ответа у детей с суставным синдромом / А. А. Яцкив [и др.] // *Молекулярная и прикладная генетика: сб. науч. тр.* – 2019. – Т. 27. – С. 5–16.
25. Яцкив, А. А. Ассоциация полиморфных вариантов генов иммунного и воспалительного ответа, не относящихся к главному комплексу гистосовместимости, с патологией суставов у детей в Республике Беларусь / А. А. Яцкив, А. В. Сукало, Р. И. Гончарова // *Медицинская генетика.* – 2020. – Т. 19, № 9. – С. 25–36.
26. The association of *PTPN22* rs2476601 with juvenile idiopathic arthritis is specific to females / R. C. Chiaroni-Clarke [et al.] // *Genes Immun.* – 2015. – Vol. 16, № 7. – P. 495–498.
27. Protein Tyrosine Phosphatase Non-receptor 22 Gene C1858T Polymorphism in Patients with Coexistent Type 2 Diabetes and Hashimoto's Thyroiditis / F. Bulut [et al.] // *Balkan Med J.* – 2014. – Vol. 31, № 1. – P. 37–42.
28. Analysis of chosen polymorphisms rs2476601 A/G — *PTPN22*, rs1990760 C/T — *IFIH1*, rs179247 A/G — *TSHR* in pathogenesis of autoimmune thyroid diseases in children / M. Rydzewska [et al.] // *Autoimmunity.* – 2018. – Vol. 51, № 4. – P. 183–190.
29. Association of Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated Protein 4 (*CTLA4*) Gene Polymorphisms with Autoimmune Thyroid Disease in Children and Adults: Case-Control Study / W. H. Ting [et al.] // *PLoS One.* – 2016. – Vol. 11, № 4. – DOI: 10.1371/journal.pone.0154394.
30. Selmi, C. Sex and autoimmunity: proposed mechanisms of disease onset and severity / C. Selmi, M. E. Gershwin // *Expert Rev Clin Immunol.* – 2019. – Vol. 15, № 6. – P. 607–615.

N. V. Volkova¹, E. A. Aksenova², H. A. Yatskiu², N. V. Nikitchenko², A. V. Solntseva^{3,4},
R. I. Goncharova²

EFFECT OF *CTLA-4* AND *PTPN22* GENE POLYMORPHISMS ON A PREDISPOSITION TO AUTOIMMUNE THYROID DISEASES IN CHILDREN WITH TYPE 1 DIABETES MELLITUS

¹2nd City Children's Clinical Hospital

17 Narochanskaya St., 220020 Minsk, the Republic of Belarus

e-mail: volkova_nv@tut.by

²State Scientific Institution

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

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

³Educational Establishment

“Belarusian State Medical University”

83 Dzerzhinsky Ave., 220083 Minsk, the Republic of Belarus

⁴Republican Scientific and Practical Center of Pediatric Oncology, Hematology and Immunology

43 Frunzenskaya St., 223053 Borovlyany village, Minsk Region, the Republic of Belarus

We investigated the allele and genotype frequencies in the polymorphic loci of *CTLA-4* (rs231775) and *PTPN22* (rs2476601) genes in children with autoimmune polyglandular syndrome (APS) of type 3a (n = 49) and with type 1 diabetes mellitus (DM) (n = 96). The control group consisted of children without autoimmune diseases (n = 400 for the rs2476601 polymorphism of the *PTPN22* gene, 320 for the rs231775 polymorphism of the *CTLA-4* gene). The results of a comparative analysis of the genotype distribution by the rs231775 locus of the *CTLA-4* gene in the studied groups allow distinguishing this polymorphism as a risk marker for a predisposition to APS type 3a in children with type 1 diabetes and in healthy children. The revealed differences in the frequency of allelic variants by the rs2476601 locus of the *PTPN22* gene in patients with type 3a APS in comparison with the control group indicate that this locus is a genetic risk factor for APS type 3a in the Belarusian population of children. At that, the absence of differences between patients with type 3a APS and isolated type 1 diabetes does not allow us to consider this polymorphism as a risk marker for APS type 3a in children with type 1 diabetes.

Keywords: autoimmune thyroid diseases, type 1 diabetes mellitus, type 3 autoimmune polyglandular syndrome, genetic polymorphism, children.

Дата поступления в редакцию: 13 февраля 2024 г.

ИНСТРУКЦИЯ ДЛЯ АВТОРОВ ПО ОФОРМЛЕНИЮ СТАТЕЙ

Редакция сборника научных трудов «Молекулярная и прикладная генетика» принимает к рассмотрению обзорные 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 реферировается 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 отключена*. 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 буквами как в предложении, 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*; пишем: Государственное научное учреждение «Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси») 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_{cp});
- 5) обозначения химических элементов и соединений (Р, H_2O);
- 6) названия белков;
- 7) скобки () и запятые (,) в формулах и после них ($x^2 - 0,5b(1,5 + ca)$).

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

Без пробелов следует проставлять:

- 1) дефис (-) в сложных словах (минерал-индикатор, К-пространство) и при наращении падежных окончаний к цифрам и буквам (1-го, j-го);
- 2) короткое тире (–) (Ctrl + «←» на нумерационной клавиатуре) между цифрами, обозначаю-

щими пределы какой-либо величины (20–30 чел.);

3) знаки $-$, $+$, \leq , $>$ в значении положительной или отрицательной величины, степени увеличения или уменьшения;

4) знак %;

5) скобки $()$ и кавычки « $\rangle\rangle$ от заключенных в них слов (по всей работе кавычки должны быть одного рисунка — «елочки»).

С пробелами проставлять:

1) тире ($—$) (Ctrl + Alt + « \rightarrow » на нумерационной клавиатуре) с обеих сторон пробелом как знак препинания между словами.

2) математические знаки ($-$, $+$, \leq , \pm , \cdot , \times , $=$, \notin 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 пар-

тнеров, необходимо 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 (ВАК–Нормативные правовые акты–Приказы ВАК–Образцы оформления БО...). 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** (в печатном виде) о возможности опубликования в открытой печати.
- 2. Сопроводительное письмо** (в печатном виде), 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** (в электронном виде), включающие ФИО (полностью), год рождения, служебный адрес, адрес электронной почты, ученую степень, ученое звание, должность. Сведения об авторах предоставляются отдельным документом Word.

Два экземпляра статьи (один — с указанием в «шапке» авторов и мест работы (на русск. и англ. яз.), другой — без) и сопроводительные документы представляются лично либо по почте на адрес: Республика Беларусь, 220072, г. Минск, ул. Академическая, 27. 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. **Обращаем Ваше внимание!** Редакция может выборочно проверить статьи системой антиплагиат (статьи направляются на проверку (антиплагиат) в Национальную библиотеку Беларуси).

Научное издание

МОЛЕКУЛЯРНАЯ И ПРИКЛАДНАЯ ГЕНЕТИКА

СБОРНИК НАУЧНЫХ ТРУДОВ

Том 36

Ответственный за выпуск *Е. М. Селихова*
Переводчик *М. Г. Пыжова*

Подписано в печать 15.04.2024 г. Формат 60×84¹/₈. Бумага офсетная. Гарнитура Times.
Печать цифровая. Усл. печ. л. 20,46. Уч.-изд. л. 16,26. Тираж 80 экз.

Отпечатано в ООО «Оскар-Принт»
Свидетельство о государственной регистрации издателя, изготовителя
и распространителя печатных изданий № 2/190 от 23.11.2016 г.
220134, г. Минск, ул. Бурдейного, 22, п. 204.

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.