ISSN 1999-9127

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

МОЛЕКУЛЯРНАЯ И ПРИКЛАДНАЯ ГЕНЕТИКА

СБОРНИК НАУЧНЫХ ТРУДОВ
ТОМ 37

Издается с 2005 года
Выходит два раза в год

Минск
2024

УДК [577.21+575] (082)

Молекулярная и прикладная генетика: сб. науч. тр. / Ин-т генетики и цитологии НАН Беларуси; редкол.: А. В. Кильчевский (гл. ред.) [и др.]. – Минск: Ин-т генетики и цитологии НАН Беларуси, 2024. – Т. 37. – 110 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,
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. Гришкова — ответственный секретарь.

УДК [577.21+575] (082)
ISSN 1999-9127

© Институт генетики
и цитологии НАН Беларуси, 2024

СОДЕРЖАНИЕ

Г. В. Мозгова, М. С. Парфенчик, А. А. Буракова, В. Н. Кипень, В. А. Лемеш, Л. В. Хотылёва
Применение молекулярных и физиологических маркеров для комплексного исследования устойчивости представителей семейства *Brassicaceae* L. к абиотическому стрессу: холоду и засухе 5

С. В. Пантелеев, Л. В. Ветчинникова, А. Ф. Титов, П. С. Кирьянов, О. Ю. Баранов
Молекулярно-генетическая оценка древесины и коры разных видов березы, полученных в ходе копулировочных прививок и трансплантации камбийсодержащих участков коры 15

А. Н. Заинчковская, Е. А. Фомина, А. В. Ярошевич, А. А. Зубкович, О. Ю. Урбанович
Изучение влияния холодового стресса на уровень экспрессии генов *HvCBF14* и *HvCOR14b* у сортообразцов озимого ячменя в моделируемых условиях 26

А. Н. Верчук, А. В. Кильчевский
Криминалистическая дифференциация представителей рода *Pinus* с помощью маркера ДНК-штрихкодирования *rbcL* 36

Т. В. Долматович, Н. С. Сазанович, В. Н. Кипень
Изучение генетического разнообразия лошадей белорусской упряжной породы 50

Е. П. Михаленко, Д. В. Лапицкий, Ю. В. Полюхович, Н. П. Митьковская, А. В. Кильчевский
Анализ полиморфных вариантов генов *VEGFA*, *KDR* и их гаплотипов у пациентов с ишемической болезнью сердца и хронической обструктивной болезнью легких 59

В. Н. Кипень, А. О. Хоров, В. А. Лемеш, Е. И. Ходоронок, А. А. Буракова, О. И. Добыш
Молекулярно-генетический статус пациентов с трижды негативным раком молочной железы по результатам KASP-генотипирования 71

О. В. Евдокимова, А. А. Муратова, А. Э. Охремчук, М. А. Сиколенко, Л. Н. Валентович
Анализ геномов молочнокислых бактерий, перспективных для создания систем экспрессии гетерологичных генов 82

М. А. Винтер, А. И. Зинченко
Создание рекомбинантного бактериального штамма-продуцента хитиндеацетилазы 95

CONTENTS

G. V. Mozgova, M. S. Parfenchyk, A. A. Burakova, V. N. Kipen, V. A. Lemesh, L. V. Khotyleva
Applying molecular and physiological markers for a comprehensive study of the *Brassicaceae* L. family tolerance to abiotic stress: cold and drought 5

S. V. Panteleev, L. V. Vetchinnikova, A. F. Titov, P. S. Kiryanov, O. Yu. Baranov
Molecular genetic analysis of wood and bark of different birch species obtained during the copulation graftings and transplantation of bark areas containing cambium 15

A. N. Zainchkovskaya, A. A. Famina, A. V. Yaroshevich, A. A. Zubkovich, O. Yu. Urbanovich
Study of the effect of cold stress on the expression level of the *HvCBF14* and *HvCOR14b* genes in winter barley variety samples under simulated conditions 26

A. N. Viarchuk, A. V. Kilchevsky
Forensic differentiation of the genus *Pinus* representatives using the DNA barcoding marker *rbcL* 36

T. V. Dolmatovich, N. S. Sazanovich, V. N. Kipen
Genetic diversity study of Belarusian harness horses 50

A. P. Mikhalenka, D. V. Lapitski, Yu. V. Polyukhovich, N. P. Mitkovskaya, A. V. Kilchevsky
Analysis of the polymorphic variants of *VEGFA*, *KDR* genes and their haplotypes in patients with ischemic heart disease and chronic obstructive pulmonary disease 59

V. N. Kipen, A. O. Khorau, V. A. Lemesh, E. I. Hodoronok, A. A. Burakova, O. I. Dobysh
Molecular genetic status of patients with triple-negative breast cancer according to KASP genotyping results 71

O. V. Evdokimova, A. A. Muratova, A. E. Akhremchuk, M. A. Sikolenko, L. N. Valentovich
Genome analysis of lactic acid bacteria promising for the development of heterologous gene expression 82

M. A. Vinter, A. I. Zinchenko
Engineering of recombinant bacterial chitin deacetylase production strain 95

УДК 577.1:576.32/.36

Г. В. Мозгова, М. С. Парфенчик, А. А. Буракова, В. Н. Кипень, В. А. Лемеш, Л. В. Хотылёва

ПРИМЕНЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫХ И ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ ДЛЯ КОМПЛЕКСНОГО ИССЛЕДОВАНИЯ УСТОЙЧИВОСТИ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ СЕМЕЙСТВА *BRASSICACEAE* L. К АБИОТИЧЕСКИМ СТРЕССАМ: ХОЛОДУ И ЗАСУХЕ

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

В исследовании дана характеристика 15 генотипов представителей семейства *Brassicaceae* L., выращенных в условиях кратковременного холодового стресса (+3 °С) и засухи (7,5% ПЭГ 6 000), по физиологическому показателю (утечка электролитов) и двум микросателлитным маркерам, ассоциированным с устойчивостью к абиотическому стрессу (Na10-C03, O1l13-G05). Установлена значимая связь между наличием отдельных аллелей микросателлитного маркера Na10-CO3 и вариацией показателя «электрическая кондуктивность» форм видов *B. napus* и *B. rapa* в условиях холодового стресса. Сорта рапса Гордон КВС и Кодиак, несущие аллель 334 п. н. и обладающие низкими значениями электрической кондуктивности в условиях холодового стресса, являются ценными генотипами при селекции на холодоустойчивость. Сорт капусты полевой Gruber рекомендован для использования в качестве контроля для исследования механизмов холодостойкости и засухоустойчивости.

Ключевые слова: абиотический стресс, малоновый диальдегид, *Brassica* L., микросателлитные маркеры, электрическая кондуктивность, утечка электролитов.

Для цитирования: Применение молекулярных и физиологических маркеров для комплексного исследования устойчивости представителей семейства *Brassicaceae* L. к абиотическому стрессу: холоду и засухе / Г. В. Мозгова, М. С. Парфенчик, А. А. Буракова [и др.] // Молекулярная и прикладная генетика: сб. науч. тр. / Ин-т генетики и цитологии НАН Беларуси; редкол.: А. В. Кильчевский (гл. ред.) [и др.]. – Минск, 2024. – Т. 37. – С. 5–14.

Введение

Семейство Капустные (*Brassicaceae* L.) включает в себя ценные сельскохозяйственные культуры масличного, кормового и овощного назначения, такие как рапс, сурепица, репа, брюква, капуста огородная и др. [1]. Рапс — естественный амфидиплоид, возникший в результате скрещивания капусты полевой *Brassica rapa* (*B. campestris*) (n = 10, геном AA) с капустой огородной *Brassica oleracea* (n = 9, геном CC) и последующего удвоения числа хромосом. В кариотипе *B. napus* присутствует 38 хромосом (n = 19, геном AACC). Таким образом, *B. napus* имеет наиболее сложный геном по сравнению с другими представителями семейства *Brassicaceae*, и многие гены, контролирующие хозяйственно-ценные признаки, представлены в двух и более копиях, расположенных в A- и C-геномах аллотетраплоидного генома [2], хромосомы которого обозначаются от A01 до A10 и от C01 до C09 [3].

За период роста и развития растения подвергаются различным типам стресса, таким как абиотические (засуха, экстремальные температуры, засоление, тяжелые металлы) и биотические (вредители, болезни), из которых абиотические стрессы являются основными факторами, влияющими на рост и урожайность продовольственных культур [4, 5]. Исследование механизмов формирования устойчивости к пониженным температурам и засухе у представителей семейства *Brassicaceae*, а также работы по ДНК-маркированию ценных генотипов для создания сортов с повышенной устойчивостью к пониженным тем-

пературам и засухе являются актуальными, поскольку на рост, развитие и, как следствие, продуктивность сельскохозяйственных сортов данного семейства оказывают воздействие оба вида абиотического стресса.

Устойчивость к жаре и засухе, как и к холоду, является сложно наследуемым признаком и контролируется количественными генами. Установлено, что индуцированная жарой или холодом перекрестная толерантность — распространенное для растительного мира явление, которое возникает в результате совместной активации множества стрессовых сигнальных факторов, изменения экспрессии ряда генов, включая сигнальные пути с вовлечением абсцизовой кислоты, генов, контролирующих синтез ненасыщенных жирных кислот, ряда транскрипционных факторов [6, 7]. В то время как конкретные механизмы восприятия и адаптации зависят от типа стрессов, итоговые процессы передачи сигнала опираются на схожие сигнальные пути [8].

Для растений характерны три фазы развития стресса [9]: 1) первичная стрессовая реакция; 2) адаптация; 3) истощение. На первом этапе, когда внешняя клеточная мембрана стимулируется абиотическим стрессом, происходит повышение проницаемости мембран, вход ионов кальция в цитоплазму, усиление поглощения кислорода, ускоренное потребление АТФ, развитие свободнорадикальных процессов. Установлено, что с целью поддержания стабильности внутриклеточной среды, уменьшения стресса и повреждений клеток растений при воздействии низких температур и засухи, растения способны удалять химически активный кислород путем регулирования активности защитных ферментов, изменения концентрации внутриклеточного пролина, растворимых сахаров и белков [10].

«Относительная электропроводность тканей» считается важным показателем, имеющим значительную отрицательную корреляцию с устойчивостью к холоду у *B. napus* [12]. При воздействии низких температур и засухи происходит утечка (отток) электролитов из тканей и клеток, перестройка метаболизма и в некоторых случаях гибель клеток, что является одной из основных реакций растения на стресс [13]. Отток электролитов из клетки растения под действием стрессового фактора можно измерить как электрическую кондуктивность раствора. Выявлено также, что при высокой концентрации активного кислорода происходит окисление липидов мембран и увеличивается содержание малонового диальдегида (англ. Malondialdehyde, сокр. — MDA), что приводит к снижению устойчивости к холоду [11]. Поэтому физиологические показатели «содержание MDA» и «относительная электропроводность тканей» используются для непрямой оценки устойчивости к холоду и засухе у растений [12, 14]. В исследовании H. L. Huang с соавторами были выявлены пять SSR-маркеров, ассоциированных с относительной электропроводностью, и шесть SSR-маркеров, ассоциированных с содержанием MDA [12]. Маркер Na10-CO3 показал достоверную положительную корреляцию с обоими индексами (содержание MDA и относительная электропроводность) у *B. napus* и *B. rapa*, и было установлено его расположение на хромосоме A01. В ряде исследований была изучена холодоустойчивость у представителей семейства *Brassicaceae* и выявлена ассоциация между электропроводностью тканей и микросателлитным маркером O1113-G05 [15, 16].

Целью работы являлось применение молекулярных и физиологических маркеров для комплексного исследования устойчивости к абиотическому стрессу и выявление закономерностей реакции на холодовой стресс и засуху у представителей семейства *Brassicaceae* L., включая рапс, капусту полевую и капусту огородную.

Материалы и методы

Характеристика и условия выращивания растительного материала. Для анализа были использованы образцы коллекции представителей семейства *Brassicaceae*, различного географического происхождения, включающие девять сортов рапса, три сорта капусты огородной и три сорта капусты полевой (табл. 1).

Семена высаживали в пластиковые горшки диаметром 6 см (по четыре семени на горшок, по восемь горшков на сорт для контроля, холода и засухи), наполненные стерильной почвой (Терра Вита, Россия). Семена прорастали в течение 3–5 дней при комнатной температуре и естественном освещении. Растения росли до стадии четвертого листа (около четырех

Таблица 1

Характеристика изучаемых сортов рапса (*B. napus*), капусты огородной (*B. oleraceae*) и капусты полевой (*B. rapa* ssp. *oleifera*)

№	Вид	Геном	Сорт	Страна, фирма
1	*B. napus*	AACC (n = 19)	Гордон KBC	KWS
2	*B. napus*	AACC (n = 19)	Мартын	Беларусь
3	*B. napus*	AACC (n = 19)	Днепр	Беларусь
4	*B. napus*	AACC (n = 19)	Кодиак	Германия
5	*B. napus*	AACC (n = 19)	Зорный	Беларусь
6	*B. napus*	AACC (n = 19)	Orig senraps	Швеция
7	*B. napus*	AACC (n = 19)	Буян	Беларусь
8	*B. napus*	AACC (n = 19)	Jet Neuf	Франция
9	*B. napus*	AACC (n = 19)	Витовт	Беларусь
10	*B. oleraceae*	CC (n = 9)	Каменная голова	Польша
11	*B. oleraceae*	CC (n = 9)	Гигант	Франция
12	*B. oleraceae*	CC (n = 9)	Морана	Беларусь
13	*B. rapa* ssp. *oleifera*	AA (n = 10)	Gruber	Финляндия
14	*B. rapa* ssp. *oleifera*	AA (n = 10)	Латвийская	Латвия
15	*B. rapa* ssp. *oleifera*	AA (n = 10)	Злата	Россия

недель). Сеянцы поливали водой и четыре раза раствором среды Мурасиге и Скуга (MS, Sigma) половинной концентрации по мере необходимости. Всего было посажено 24 горшка для каждого генотипа, которые случайным образом были разделены на три группы при достижении растениями стадии четырех листьев. Каждая группа, состоящая из восьми горшков (примерно 32 растения), была помещена в следующие условия: а) контрольные — регулярный полив водой; б) засуха — регулярный полив 7,5%-ым раствором ПЭГ; в) холод — регулярный полив водой, выращивание в климатической камере при +3 °C в течение 18 ч. Образцы листьев для анализа собирали после 48 ч засухи и 18 ч холодового стресса.

Определение электрической кондуктивности. Электрическую кондуктивность измеряли с помощью кондуктометра (DDS-11A, Shanghai Pengshun Science Co., Ltd., Китай) как описано B. Jiang с соавторами [17]. Для групп исследуемых растений навески листьев от пяти растений массой 0,1 г (в трехкратной повторности) собирали в пробирки объемом 15 мл, содержащие 8 мл деионизированной воды, и измеряли электропроводность как S0 (нулевая электропроводность). Образцы осторожно встряхивали при 25 °C, инкубировали в течение 2 ч и измеряли электропроводность как S1 (первая электропроводность). Затем образцы кипятили 20 мин, встряхивали и после остывания до 25 °C (около 20 мин) измеряли полученную электропроводность как S2 (полная электропроводность). Электрическую кондуктивность рассчитывали по формуле:

$$(S1 – S0) / (S2 – S0) \times 100\%.$$

Выделение ДНК и молекулярно-генетический анализ. Для выделения ДНК использовали навеску листьев массой 100 мг, взятую от пяти растений каждого сорта (в трехкратной повторности). Гомогенизация образцов производилась посредством TissueLyser II (Qiagen, Германия). ДНК из листьев выделялась при помощи набора «S-сорб» (НПК «Синтол», Россия) согласно инструкции производителя. Концентрацию ДНК и степень ее очистки определяли с использованием спектрофотометра Implen Nano Photometer N50 (Implen, Германия). Для оценки нативности ДНК дополнительно проводили электрофоретическое разделение препаратов ДНК в 1,0%-ом агароз-

ном геле (1X ATE-буфер, 90В, 60 мин). Далее концентрация ДНК для всех образцов была стандартизирована до 25 нг/мкл.

В работе были использованы SSR-маркеры, ассоциированные с относительной электропроводностью тканей (O1113-G05) и относительной электропроводностью тканей и содержанием MDA (Na10-CO3) [15]. ПЦР с SSR-маркером Na10-CO3, используя праймеры 5'-TTGGGTGTCTTTGTTACCCC-3' и 5'-ACCGAGAAGACTGATACGGG-3', с SSR-маркером O1113-G05, используя праймеры 5'-GTGTGCAGGAAACGATGTTC-3' и 5'-GGGAGTTTGAAGAGAAAGCG-3', проводили в 25 мкл реакционной смеси, содержащей 1x ArtMix MM (ООО «АртБиоТех, Беларусь), 0,40 мкМ каждого праймера и 50 нг тотальной ДНК. ПЦР проводили на амплификаторе SimpliAmp Thermal Cycler (Applied Biosystems, США) со следующими условиями реакции амплификации: 95 °С — 5 мин; 35 циклов: 95 °С — 15 сек, 58 °С (для ДНК-маркера Na10-CO3) и 56 °С (для ДНК-маркера O1113-G05) — 30 сек, 72 °С — 45 сек; 72 °С —10 мин. ПЦР-продукты разделяли электрофорезом в 2,0%-ом агарозном геле с добавлением раствора бромида этидия до конечной концентрации 0,5 мкг/мл при напряжении 90В в течение 60 мин. Результаты электрофореза документировали с использованием системы E-Box CX5 (Vilber, Германия), ПО E-Box CX5 TS Edge 18.01.

Статистическая обработка данных. Непараметрический дисперсионный анализ (тест Краскела-Уоллиса и post-hoc Dunn тест) был выполнен в R (версия 4.1.2) с использованием пакета stats [18], рисунок был создан с помощью пакета ggplot2 [19].

Результаты и обсуждение

Проведенные исследования девяти сортов рапса, трех сортов капусты огородной и трех сортов капусты полевой позволили выявить, что показатель «электрическая кондуктивность» в условиях пониженных температур статистически значимо (p-значение <0,05) отличается от показателя «электрическая кондуктивность» в условиях засухи для каждого из проанализированных сортов (рис. 1).

В условиях холодового стресса максималь-

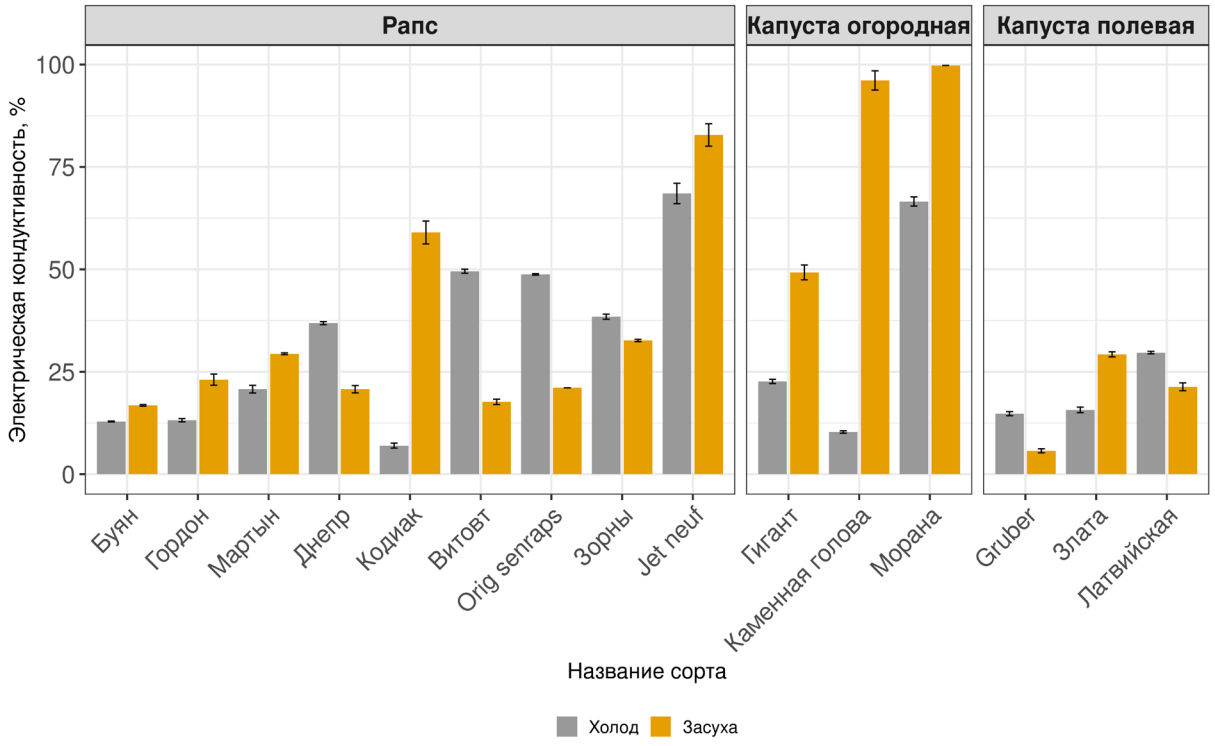

Рис. 1. Значения электрической кондуктивности (± стандартное отклонение) для изучаемых сортов в условиях холодового стресса и засухи. Указанные значения статистически значимо отличаются для каждого сорта в условиях засухи и холода

ная электрическая кондуктивность среди сортов рапса была у сорта Jet Neuf (70,01%), минимальная — у сорта Кодиак (6,27%); максимальная среди сортов капусты огородной была у сорта Морана (66,57%), минимальная — у сорта Каменная голова (10,31%); максимальная среди сортов капусты полевой была у сорта Латвийская (29,68%), минимальная — у сорта Gruber (14,78%). В условиях засухи максимальная электрическая кондуктивность среди сортов рапса была у сорта Jet Neuf (82,82%), минимальная — у сорта Буян (16,8%); максимальная среди сортов капусты огородной — у сорта Морана (99,9%), минимальная — у сорта Гигант (49,2%); максимальная среди сортов капусты полевой — у сорта Злата (29,2%), минимальная — у сорта Gruber (5,21%). При сравнении показателя «средняя электрическая кондуктивность» у изучаемых видов семейства Капустные, минимальное среднее значение в условиях холодового стресса и засухи выявлено у вида Капуста полевая, максимальное — у вида Капуста огородная (табл. 2).

Таблица 2

Сравнительная характеристика видов Рапс, Капуста огородная и Капуста полевая по значениям электрической кондуктивности в условиях холодового стресса и засухи

Тип стресса	Вид	Средняя кондуктивность ± стандартное отклонение
Холод	Рапс	32,86 ± 19,98
	Капуста огородная	33,17 ± 25,62
	Капуста полевая	20,05 ± 7,24
Засуха	Рапс	33,69 ± 21,66
	Капуста огородная	81,71 ± 24,44
	Капуста полевая	18,77 ± 10,39

Работы ряда исследовательских групп позволили установить, что сорта с высоким содержанием MDA имеют более высокий уровень перекисного окисления липидов мембран, что приводит к снижению устойчивости к холоду [11], а относительная проводимость отрицательно коррелирует с устойчивостью к холоду у *B. napus* и *B. rapa* [12] и засухе у цветной капусты [20]. Поэтому эти физиологические показатели могут быть использованы как физиологические маркеры для оценки устойчивости к холоду и засухе у растений. Ранее также было установлено, что у отдельных форм *B. napus* и *B. rapa* ДНК-маркер Na10-CO3 показал достоверную положительную корреляцию с содержанием MDA и относительной электропроводностью тканей [12, 15].

Проведенный нами анализ представителей семейства *Brassicaceae* с использованием SSR-маркера Na10-CO3 позволил установить вариацию выявляемых аллелей у исследованных образцов: гомозиготы либо гетерозиготы по аллелям 222 и 334 п. н., либо отсутствие обоих аллелей. По микросателлитному локусу, выявляемому SSR-маркером O1113-G05, детектировался аллель 127 п. н. у всех исследуемых сортов, кроме сорта капусты полевой Gruber (табл. 3).

Таблица 3

Результаты исследования образцов с помощью SSR-маркеров, коррелирующих с физиологическими индексами морозостойкости

№	Вид	Сорт	Локус	
			Na10-CO3	O1113-G05
1	*B. napus*	Гордон КВС	334	127
2	*B. napus*	Мартын	222	127

Окончание таблицы 3

№	Вид	Сорт	Локус	
			Na10-CO3	O1l13-G05
3	*B. napus*	Днепр	222	127
4	*B. napus*	Кодиак	334	127
5	*B. napus*	Зорный	222	127
6	*B. napus*	Orig senraps	222	127
7	*B. napus*	Буян	222	127
8	*B. napus*	Jet Neuf	222	127
9	*B. napus*	Витовт	222	127
10	*B. oleraceae*	Каменная голова	–	127
11	*B. oleraceae*	Гигант	–	127
12	*B. oleraceae*	Морана	–	127
13	*B. rapa* ssp. *oleifera*	Gruber	334	–
14	*B. rapa* ssp. *oleifera*	Латвийская	222/334	127
15	*B. rapa* ssp. *oleifera*	Злата	334	127

Все исследуемые растения были отнесены к одной из четырех групп, в зависимости от выявленного ДНК-маркером Na10-CO3 аллеля (табл. 4). Статистически значимая разница выявлена по показателю «электрическая кондуктивность» между указанными группами генотипов в условиях холодового стресса (p-значение = 0,00135) и засухи (p-значение = 0,000628). Попарные сравнения между группами показали, что в условиях холодового стресса статистически значимые различия выявлены между группами 1 и 2 (p-значение = 0,0000848) и между группами 1 и 4 (p-значение = 0,0298). Остальные попарные сравнения значений средней электрической кондуктивности для групп генотипов в условиях холодового стресса оказались статистически не значимыми. При этом в условиях засухи установлена статистически значимая разница только между группой 4 и группами 1, 2 и 3 (p-значение = 0,00120, p-значение = 0,000132 и p-значение = 0,00429 соответственно). В результате генотипы, несущие аллель 334 п. н. (группа 1) характеризовались более низким значением электрической кондуктивности в условиях холодового стресса. В условиях засухи максимальные значения электрической кондуктивности выявлены у группы генотипов, для которых ни один аллель не был выявлен (группа 4, образцы вида *B. oleracea*, геном C).

По показателю «электрическая кондуктивность» не было выявлено достоверных статистических различий между группами 1–3 в смоделированных условиях засухи. Минимальные значения средней электрической кондуктивности получены для генотипов, несущих аллели 222 и 334 п. н. (группа 3), однако они незначительно отличались от значений, полученных для групп 1 и 2 (табл. 4). В этой связи можно предположить, что на устойчивость к данному типу абиотического стресса влияет не определенный аллель, а наличие конкретного локуса генома A, выявляемого с помощью ДНК-маркера Na10-CO3. Поскольку все коммерческие сорта капусты огородной, использованные в данном исследовании, характеризуются производителями как устойчивые к холоду, предполагается, что, несмотря на отсутствие указанного локуса в геноме *B. oleracea*, изученные сорта капусты огородной являются холодостойкими за счет альтернативных метаболических путей.

Было установлено, что фрагмент размером 127 п. н., детектируемый с помощью SSR-маркера O1l13-G05, также коррелирует с относительной электропроводностью тканей [15, 21]. В нашем исследовании аллель 127 п. н., выявляемый с помощью ДНК-маркера O1l13-G05, был обнаружен у всех исследуемых сортов, кроме сорта капусты полевой Gruber. Элек-

Таблица 4

Сравнительная характеристика изучаемых растений по средним значениям электрической кондуктивности в условиях холодового стресса и засухи в зависимости от полиморфизма молекулярного маркера Na10-C03

Тип стресса	Сорт	Группа	Маркер Na10-C03	Среднее значение кондуктивности и 25–75-й процентили
Холод	Гордон КВС, Кодиак, Злата, Gruber	1	Аллель 334	12,7 (11,4–15,10)
	Мартын, Днепр, Зорны, Orig senraps, Буян, Витовт, Jet Neuf	2	Аллель 222	39,6 (21,50–49,01)
	Латвийская	3	Аллель 222/334	29,71 (28,75–35,72)
	Каменная голова, Гигант, Морана	4	Нет ампликона	33,23 (10,65–65,66)
Засуха	Гордон КВС, Кодиак, Злата, Gruber	1	Аллель 334	29,33 (18,12–36,68)
	Мартын, Днепр, Зорны, Orig senraps, Буян, Витовт, Jet Neuf	2	Аллель 222	31,09 (18,04–32,35)
	Латвийская	3	Аллель 222/334	21,34 (20,78–32,08)
	Каменная голова, Гигант, Морана	4	Нет ампликона	81,72 (51,29–99,77)

трическая кондуктивность у растений сорта Gruber была статистически значимо ниже (p-значение = 0,00444) в условиях засухи, чем у генотипов, несущих аллель 127 п. н. (табл. 5). Так как сорт Gruber также характеризуется наличием аллеля, детектируемого с помощью SSR-маркера Na10-CO3, ассоциированного с холодостойкостью, и относится к группе 1 с достоверным наименьшим показателем «электрической кондуктивности» в смоделированных условиях холода, это делает перспективным его использование в качестве контрольного сорта для дальнейшего исследования механизмов формирования как засухоустойчивости, так и холодостойкости у семейства *Brassicaceae*.

Проведенное нами исследование форм видов *B. napus* и *B. rapa* позволило установить достоверную связь между наличием отдельных аллелей локуса генома А, выявляемого с помощью SSR-маркера Na10-CO3, и вариацией показателя «электрическая кондуктивность» в смоделированных условиях холода. Предполагается, что у образцов *B. oleracea*, у которых отсутствует геном А, в реализации механизмов холодо- и засухоустойчивости задействованы альтернативные метаболические пути [21]. Сорта рапса Гордон КВС (устойчив к засухе на

Таблица 5

Сравнительная характеристика изучаемых растений по средним значениям электрической кондуктивности в условиях холодового стресса и засухи в зависимости от полиморфизма молекулярного маркера O1l13-G05

Тип стресса	Маркер O1l13-G05	Среднее значение кондуктивности и 25–75-й процентили	p-значение
Холод	Нет ампликона	15,07 (14,64–15,07)	0,265
	Аллель 127	26,41 (13,41–48,66)	
Засуха	Нет ампликона	5,71 (5,47–5,97)	0,00444
	Аллель 127	29,29 (21,09–57,86)	

7 баллов из 9, зимостойкий — на 6 баллов из 9) и Кодиак (перезимовка на уроне 100% [22]) и сорта капусты полевой Gruber (выведен в условиях рискованного земледелия, Финляндия) и Злата (зимостойкий сорт, среднеустойчив к засухе) являются носителями аллеля 334 п. н. микросателлитного локуса Na10-C03, ассоциированного с холодоустойчивостью.

Изученные сорта рапса и капусты полевой являются носителями аллелей 222 и/или 334 п. н. микросателлитного локуса, выявляемого с помощью ДНК-маркера Na10-C03. Не было установлено статистически значимой разницы между группами генотипов 1, 2 и 3, включающих сорта рапса (геном AACC) и капусты полевой (геном AA), по показателю «среднее значение электрической кондуктивности» в смоделированных условиях засухи. При этом для группы 4, представленной сортами капусты огородной (геном CC), установлено статистически значимое увеличение показателя «средняя электрическая кондуктивность», которое ассоциировано с увеличением степени повреждения мембран клеток при абиотическом стрессе. Поскольку в этой группе локус, выявляемый с помощью ДНК-маркера Na10-C03, не детектировался, можно предположить, что на устойчивость к данному типу абиотического стресса влияет наличие локуса генома A. При этом изученные генотипы капусты огородной (Каменная голова, Гигант, Морана), которые, по данным производителей, являются холодо- и засухоустойчивыми, показали большую холодоустойчивость в сравнении с устойчивостью к засухе, что может быть связано с влиянием температуры выращивания. Поскольку указанные сорта капусты создавались озимыми и засухо-, морозоустойчивыми, то фактор температуры (25 °C) мог повлиять на физиологический показатель «утечка электролитов» при моделировании условий засухи.

Заключение

Подводя итог вышесказанному, девять сортов рапса, три сорта капусты огородной и три сорта капусты полевой оценены по физиологическому показателю «утечка электролитов» в условиях кратковременного холодового стресса и кратковременной засухи, а также охарактеризованы по двум микросателлитным маркерам, ассоциированным с устойчивостью к абиотическому стрессу (Na10-C03, O1113-G05). У исследованных форм видов *B. napus* и *B. rapa* установлена достоверная связь между наличием отдельных аллелей локуса хромосомы A01, выявляемого с помощью SSR-маркера Na10-CO3, и вариацией электрической кондуктивности в смоделированных условиях холода. Предполагается, что у образцов *B. oleracea*, у которых отсутствует геном A, в реализации механизмов засухоустойчивости задействованы альтернативные метаболические пути. Сорта рапса Гордон КВС и Кодиак, несущие аллель холодостойкости и обладающие низкими средними значениями показателя «электрическая кондуктивность» в условиях холодового стресса, являются ценными генотипами при селекции на холодоустойчивость. Сорт капусты полевой Gruber рекомендован для использования в качестве контрольного сорта для дальнейшего исследования механизмов холодоустойчивости и засухоустойчивости.

Список использованных источников

1. Combined influence of low temperature and drought on different varieties of rapeseed (*Brassica napus* L.) / Q. Q. Xu [et al.] // South Afr. J. Bot. – 2022. – Vol. 147. – P. 400–414.

2. Whole-genome resequencing reveals *Brassica napus* origin and genetic loci involved in its improvement / K. Lu [et al.] // Nat. Commun. – 2019. – Vol. 10, № 1. – P. 1 154.

3. Long-read assembly of the *Brassica napus* reference genome Darmor-bzh / M. Rousseau-Gueutin [et al.] // GigaScience. – 2020. – Vol. 9, № 12. – P. giaa137.

4. Genomic resources in plant breeding for sustainable agriculture / M. Thudi [et al.] // J. Plant Physiol. – 2021. – Vol. 257. – P. 153351.

5. Abiotic stress responses in plants / H. Zhang [et al.] // Nat. Rev. Genet. – 2022. – Vol. 23, № 2. – P. 104–119.

6. Identification of differentially expressed genes involved in amino acid and lipid accumulation of winter turnip rape (*Brassica rapa* L.) in response to cold stress / Y. Fang [et al.] // PLOS ONE. – 2021. – Vol. 16, № 2. – P. e0245494.

7. Ma, Z. Understanding AP2/ERF transcription factor responses and tolerance to various abiotic stresses in plants: a comprehensive review /

Z. Ma, L. Hu, W. Jiang // Int. J. Mol. Sci. – 2024. – Vol. 25, № 2. – P. 893.

8. Zhang, H. Thriving under stress: how plants balance growth and the stress response / H. Zhang, Y. Zhao, J.-K. Zhu // Dev. Cell. – 2020. – Vol. 55, № 5. – P. 529–543.

9. Cook, G. Genetically Modified Language : The discourse of arguments for GM crops and food. Genetically modified language / G. Cook. – London; Routledge, 2004. – 176 p.

10. Exploring the mechanisms of WRKY transcription factors and regulated pathways in response to abiotic stress / S. Li [et al.] // Plant Stress. – 2024. – Vol. 12. – P. 100429.

11. Cold resistance and changes in MDA and soluble shugar of lives of *Ligustrun lucidum* Ait in winter / Y. Lin [et al.] / Chinese Agricultural Science Bulleten. – 2012. – Vol. 28. – P. 68–72.

12. Electrical conductivity analysis of 17 rapeseed (*Brassica napus* L.) varieties' cold resistance / H. L. Huang [et al.] // Hunan Agricultural Sciences. – 2014. – Vol. 21. – P. 1–3.

13. Hryvusevich, P. V. Stress-induced electrolyte leakage from root cells of higher plants: background, mechanism and physiological role / P. V. Hryvusevich, V. V. Samokhina, V. V. Demidchik // Exp. Biol. Biotechnol. – 2022. – № 2. – P. 4–18.

14. Rashtbari, M. Effect of vermicompost and municipal solid waste compost on growth and yield of canola under drought stress conditions / M. Rashtbari, A. Hossein Ali, M. Ghorchiani // Commun. Soil Sci. Plant Anal. – 2020. – Vol. 51, № 17. – P. 2 215–2 222.

15. Analysis of cold resistance and identification of SSR markers linked to cold resistance genes in *Brassica rapa* / Z. Huang [et al.] // Breed Sci. – 2017. – Vol. 67, № 3. – P. 213–220.

16. Genetic variability between several Brasicaceae populations of different winter survival ability / B. Rakić [et al.] // Sustainable Development in Cruciferous Oilseed Crops Production: Congress Proceedings 12th International Rapeseed Congress, Wuhan, 26–30 March 2007: in 5 Vol. / Science Press USA Inc.; ed.: F. Tingdong, G. Chunyun. – Beijing, 2007. – Vol. 2. – P. 78–80.

17. PIF3 is a negative regulator of the CBF pathway and freezing tolerance in *Arabidopsis* / B. Jiang [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. – 2017. – Vol. 114, № 32. – E6695–E6702.

18. R: The R Project for Statistical Computing [Электронный ресурс]. – Режим доступа: https://www.r-project.org/. – Дата доступа: 30.08.2024.

19. Wickham, H. ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis / H. Wickham. – New York; NY: Springer, 2009. – 213 p.

20. Drought-induced changes in plant-yield interlinked biochemistry of cauliflower (*Brassica oleracea* L. var. *botrytis*) by exogenously applied alpha-tocopherol / N. Zafar [et al.] // Journal of King Saud University. – Science. – 2024. – Vol. 36, № 1. – P. 103 028.

21. Research on Biotic and Abiotic Stress Related Genes Exploration and Prediction in *Brassica rapa* and *B. oleracea*: A Review / A. Md. Kayum [et al.] // Plant Breeding and Biotechnology. – 2016. – Vol. 4. – P. 135–144.

22. Скрининг коллекционного материала озимого рапса по комплексу хозяйственно-ценных признаков в условиях центральной части Республики Беларусь / Е. С. Бык [и др.] // Земледелие и селекция в Беларуси. – 2021. – № 57. – С. 407–415.

G. V. Mozgova, M. S. Parfenchyk, A. A. Burakova, V. N. Kipen, V. A. Lemesh, L. V. Khotyleva

APPLYING MOLECULAR AND PHYSIOLOGICAL MARKERS FOR A COMPREHENSIVE STUDY OF THE *BRASSICACEAE* L. FAMILY TOLERANCE TO ABIOTIC STRESS: COLD AND DROUGHT

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

In this study, 15 genotypes of the *Brassicaceae* L. family grown under the conditions of short-term cold stress (+3 °C) and drought (7.5% PEG 6 000) were characterized by a physiological trait (electrolyte leakage) and two microsatellite markers associated with resistance to abiotic stress (Na10-C03, O1l13-G05). A significant relationship was established between the presence of individual alleles of the microsatellite marker Na10-CO3 and the variation of the electrical conductivity of *B. napus* and *B. rapa* varieties. The rapeseed varieties Gordon KVS and Kodiak, carrying the 334 allele and possessing low values of electrical conductivity under cold stress, are valuable genotypes in breeding for cold tolerance. The field cabbage variety Gruber is recommended for use as a control for studying the mechanisms of cold and drought tolerance.

Keywords: abiotic stress, malondialdehyde, *Brassica* L., microsatellite markers, electrical conductivity, electrolyte leakage.

Дата поступления в редакцию: 02 сентября 2024 г.

УДК 582.632.1+630*81:[581.81:581.165.73]

С. В. Пантелеев[1], Л. В. Ветчинникова[2], А. Ф. Титов[3], П. С. Кирьянов[1], О. Ю. Баранов[4]

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ДРЕВЕСИНЫ И КОРЫ РАЗНЫХ ВИДОВ БЕРЕЗЫ, ПОЛУЧЕННЫХ В ХОДЕ КОПУЛИРОВОЧНЫХ ПРИВИВОК И ТРАНСПЛАНТАЦИИ КАМБИЙСОДЕРЖАЩИХ УЧАСТКОВ КОРЫ

[1]Государственное научное учреждение
«Институт леса Национальной академии наук Беларуси»
Республика Беларусь, 246050, г. Гомель, ул. Пролетарская, 71
e-mail: stasikdesu@mail.ru
[2]Институт леса — обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра «Карельский научный центр Российской академии наук»
Российская Федерация, 185910, Республика Карелия, г. Петрозаводск, ул. Пушкинская, 11
[3]Институт биологии — обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра «Карельский научный центр Российской академии наук»
Российская Федерация, 185910, Республика Карелия, г. Петрозаводск, ул. Пушкинская, 11
[4]Национальная академия наук Беларуси
Республика Беларусь, 220072, г. Минск, пр-т Независимости, 66

Проведен микросателлитный анализ фрагментов тканей ствола разных видов березы, полученных в результате прививки (путем копулировки) или одной из ее разновидностей — локальной трансплантации коры (фрагментом или кольцом в виде пояса). В качестве привоя (донора) использованы ткани коры карельской березы *Betula pendula* Roth var. *carelica* (Mercklin) Hamet-Ahti, узорчатая текстура которой хорошо контрастирует с обычной (прямоволокнистой) древесиной подвоя (реципиента) — березы повислой *Betula pendula* Roth и березы пушистой *Betula pubescens* Ehrh. Установлено отсутствие заметных изменений в древесине подвоя и привоя. В случаях локальной трансплантации тканей коры вновь образуемая древесина также является производной донора и не содержит наследственного материала реципиента (генетический химеризм отсутствует), за исключением зоны срастания генетически разнородных тканей, где формирование раневой поверхности осуществляется за счет латеральной меристемы обоих компонентов. Вместе с тем обнаружено, что уровень аберрантных клеток в таких местах выше при кольцевой трансплантации коры, когда полностью «перерезаются» все нисходящие и восходящие транспортные пути вдоль оси ствола реципиента по его окружности. Сделан вывод, что после выполнения прививки (или локальной трансплантации тканей) привой (донор) и подвой (реципиент) сохраняют не только присущие им фенотипические, но и генотипические особенности, четко различаясь по спектрам выявленных аллельных вариантов, что выступает еще одним важным аргументом в пользу точки зрения о том, что узорчатая текстура древесины карельской березы является генетически детерминированным признаком.

Ключевые слова: SSR-маркеры, карельская береза, *Betula pendula* Roth var. *carelica* (Mercklin) Hamet-Ahti, береза повислая, *Betula pendula* Roth, береза пушистая, *Betula pubescens* Ehrh., прививка, трансплантация тканей, узорчатая древесина, генотипы.

Для цитирования: Молекулярно-генетическая оценка древесины и коры разных видов березы, полученных в ходе копулировочных прививок и трансплантации камбийсодержащих участков коры / С. В. Пантелеев, Л. В. Ветчинникова, А. Ф. Титов [и др.] // Молекулярная и прикладная генетика: сб. науч. тр. / Ин-т генетики и цитологии НАН Беларуси; редкол.: А. В. Кильчевский (гл. ред.) [и др.]. – Минск, 2024. – Т. 37. – С. 15–25.

Введение

Текстура и окраска древесины являются основными характеристиками, определяющими ее декоративные особенности. Особую ценность представляют редкие варианты, аналоги которых обычно не встречаются у других древесных пород или являются атипичными для конкретного вида растения. Среди них наиболее широкую известность получила карельская береза (*Betula pendula* Roth *var. carelica* (Mercklin) Hamet-Ahti), обладающая узорчатой древесиной, по структуре и характеру рисунка напоминающая мрамор. Формирование текстуры данного типа некоторыми авторами рассматривается как следствие проявления структурной аномалии, обозначаемой как «stem pitting» или ямчатость поверхности ствола [1]. В этом случае наблюдаемые изменения в ксилогенезе, как правило, связаны с особенностями пространственной ориентации клеточных делений — преобладанием поперечного и антиклинального типов вместо периклинального, доминирующего при образовании обычной прямослойной древесины. Такого рода ямчатость (хорошо видна после снятия коры) встречается у многих древесных растений (яблоня, виноград, ольха, клен, граб и др.) и представляет собой широко распространенное заболевание, причиной которого могут быть вирусы или другие факторы [1, 2].

В отличие от этого, эксперименты по прививке с использованием карельской березы в качестве привоя не выявили каких-либо дальнейших изменений в древесине у подвоя (березы повислой), что, очевидно, свидетельствует о неинфекционной природе формирования узорчатой текстуры [3]. Хотя утверждение о неинфекционном характере формирования уникальной древесины у карельской березы, строго говоря, не может считаться окончательным, поскольку постоянное развитие методов фитопатологической диагностики демонстрирует все новые механизмы формирования аномалий при ксилогенезе, вызванные паразитическими грибами, бактериями, вирусами и вирусоподобными частицами [4].

В одной из монографий приведено описание эффектов воздействия экзогенных факторов физической и химической природы на растения, вызывающих образование сходных симптомов или усиливающих проявление признаков узорчатости древесины у березы [1]. В другой монографии описаны популяционно-видовые особенности карельской березы [5]. Так, одним из неотъемлемых факторов, способствующих образованию декоративной текстуры, является освещение. Приводятся примеры поперечных спилов древесины ствола, где узорчатый рисунок более выражен с освещенной стороны дерева. Отмечено, что в условиях затененности узорчатые растения не выдерживают конкуренцию с другими, более быстрорастущими лиственными породами и могут не только терять способность к формированию узорчатой древесины и переходить к формированию свойственной для большинства видов березы прямоволокнистой структуры проводящих путей, но и терять возможность к дальнейшему росту, что приводит к их гибели [6]. Это также подтверждает важную роль светового фактора в регуляции развития элементов древесины.

Несмотря на существование разных взглядов, наследственная основа на сегодняшний день рассматривается как наиболее вероятный фактор формирования высоко декоративной узорчатой текстуры древесины у карельской березы. Подтверждением этому является сохранение данного признака при вегетативном размножении (включая клональное микроразмножение), а также выявление узорчатых фенотипов в семенном потомстве карельской березы (преобладающих при контролируемом опылении). В то же время молекулярно-генетические механизмы формирования узорчатой древесины, равно как и характер наследования данного признака, до настоящего момента остаются невыясненными. По мнению большинства исследователей, работавших с карельской березой в разные годы, узорчатый тип древесины, как и другие ее уникальные признаки (разнообразие форм роста, полиморфизм по типу поверхности ствола и др.), генетически детерминированы, но степень их проявления зависит от воздействия ряда факторов, чаще внешних [3, 5, 7–9]. На это, в частности, указывает рассмотренное выше влияние освещения на степень проявления признака узорчатости. Кроме того, узорчатость имеет и топографические особенности локализации на стволе дерева — наибольшую выраженность признак приобретает в области

выхода скелетных ветвей (узлах), а наименьшую — в междоузлиях, что особенно хорошо заметно на ранних этапах развития карельской березы. В литературе данный эффект объясняют более высоким содержанием гормонов в узловых сегментах стебля [4, 10]. Следовательно, в случае естественного формирования узорчатой древесины наблюдается своего рода «фенотипический градиент», определяемый, по всей видимости, пространственной гетерогенностью действия эндогенных факторов. Кроме анатомо-морфологической разнородности древесины карельской березы, также были выявлены различия и в транскрипционной активности многих генов при сравнении камбиальной ткани узловых сегментов и междоузлий ствола [11].

Дополнительным подтверждением наследственной природы уникальных признаков карельской березы также могут выступать результаты ее вегетативного размножения путем прививки (в качестве привоя или донора) (обозначены ранее) или трансплантации (как одной из разновидностей прививки) фрагментов коры, содержащей камбиальные ткани, на стволы, например, березы повислой или березы пушистой (в качестве подвоя или реципиента). При выполнении прививки происходит сохранение и последующее развитие у нее изначальных (собственных) фенотипических признаков, характерных привою (донору) и подвою (реципиенту). Особенностью привитых растений, в отличие от обычных узорчатых особей, является формирование относительно узкой выраженной границы в месте прививки, разделяющей фенотипически контрастные участки древесины [5]. На наш взгляд, отсутствие «анатомо-морфологического градиента» в переходной зоне может указывать на наличие определенных физиологических механизмов, обеспечивающих стабильность функционирования генов, ассоциированных с проявлением признака узорчатости древесины, в случае их активации, репрессии или супрессии.

В настоящее время основным способом получения однородного посадочного материала узорчатых форм карельской березы является клональное микроразмножение [3, 12], которое позволяет в опытных и промышленных объемах производить саженцы, сохраняющие фенотип исходного материнского дерева. Использование методов непрямого морфогенеза и клеточной селекции дает дополнительные возможности для получения новых генотипических вариантов. В то же время получение саженцев путем прививки или трансплантации также имеет ряд перспективных направлений, связанных с получением декоративных форм химерных растений, ускорением роста кустообразных и короткоствольных форм, размножением трудноукореняемых клонов и др.

Новые перспективы открывает молекулярно-генетический анализ привитых растений, причем не только для прямого практического применения как способа сертификации и верификации посадочного материала, но и для решения широкого круга фундаментальных задач, направленных, в том числе и на выявление механизмов формирования узорчатой текстуры в древесине карельской березы.

Исходя из вышесказанного, целью данного исследования явилось изучение сочетания аллельных вариантов микросателлитных локусов и плоидности тканей древесины и коры, полученных путем прививки копулировкой и локальной трансплантации коры (фрагментом и кольцевой в виде пояса) (как одной из разновидностей прививки) карельской березы на стволы березы повислой или березы пушистой с использованием семи микросателлитных маркеров.

Материалы и методы

Объектами молекулярно-генетических исследований были карельская береза *Betula pendula* Roth var. *carelica* (Mercklin) Hamet-Ahti, береза повислая *Betula pendula* Roth и береза пушистая *Betula pubescens* Ehrh. Материалом для выделения ДНК служили ткани древесины и коры, полученные в результате прививки копулировкой (привой — карельская береза, подвой — береза повислая) или локальной трансплантации коры фрагментом или кольцом в виде пояса (донор — карельская береза, реципиент — береза повислая или береза пушистая). При выполнении прививки корневую систему одного растения соединяли с кроной другого, а при трансплантации, независимо от ее типа, крона и корневая система принадлежали исключительно реципиенту. Трансплантацию тканей проводили на стволе

реципиента на высоте 1,3 м, размеры коры донора при пересадке в форме прямоугольника были 3 × 4 см, а при кольцевой (в виде пояса) — не менее 5 см по высоте относительно ствола реципиента, диаметр последнего на момент выполнения прививки составлял около 4 см. Привоем (или донором) во всех случаях была карельская береза, обладающая уникальной узорчатой текстурой древесины; подвоем (реципиентом) — береза повислая или береза пушистая с характерной для обеих прямоволокнистой текстурой древесины. Опыты по прививке и трансплантации тканей выполнены в конце 1980-х гг., спустя 4–9 лет они были спилены для проведения в последующем анатомо-морфологических исследований [13]. Для проведения молекулярно-генетического анализа с помощью сверла отбирали образцы воздушно-сухой древесины и коры (в виде мелких опилок), исключая их смешивание. Общее число проанализированных образцов составило 18.

Для генотипирования тканей древесины и коры разных видов березы использовали анализ полиморфизма микросателлитных локусов, локализованных в клеточном ядре (nSSRP). В качестве маркеров служили микросателлитные локусы или короткие простые повторы (SSR — Simple Sequence Repeate), локализованные в клеточном ядре и рекомендованные в качестве ДНК-маркеров для видов рода *Betula* L. — L2.2, L1.10, L7.8, L10.1, L022, L7.3, L5.4 [14]. Выбор данных маркеров также был обусловлен их высоким уровнем изменчивости (на основании предварительного анализа показателей полиморфизма: числа аллелей на локус (5–12), наблюдаемой и ожидаемой гетерозиготности (0,40–0,90)). Прямой праймер для каждого из маркеров на 5’-конце был мечен одним из типов красителей — 6FAM, TAMRA или HEX.

Выделение ДНК из тканей древесины и коры осуществляли по методике, описанной в монографии В. Е. Падутова с соавторами [15]. Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили с использованием коммерческой смеси, содержащей TaqHF ДНК-полимеразу (Thermo Fisher Scientific/Fermentas, Литва) согласно инструкции фирмы-изготовителя.

Амплификацию проводили по следующей программе для всех используемых праймеров: 1 этап (1 цикл): денатурация 3 мин при 94 °С. 2 этап (35 циклов): денатурация 45 сек при 94 °С, отжиг 25 сек при 60 °С, элонгация 1 мин при 72 °С. 3 этап (1 цикл): элонгация 7 мин при 72 °С. 4 этап (1 цикл): охлаждение реакционной смеси 5 мин при 4 °С.

Электрофоретическое фракционирование ампликонов SSR-маркеров проводили с помощью генетического анализатора ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific, США) в соответствии с инструкцией фирмы-производителя. Для оценки данных электрофоретического фракционирования, расчета уровня миксоплоидии, определения микросателлитной нестабильности и верификации достоверности данных использовали программу GeneMapper 4.0 (Thermo Fisher Scientific, США).

Результаты и обсуждение

Исследования показали, что в результате выполнения прививки путем копулировки и привой, и подвой сохраняли характерный для каждого из них аллельный спектр. В таблице 1 приведены данные для тканей древесины прививки (дерево ПТ-982), у которой привой — карельская береза (генотип КБ-337), подвой — береза повислая (генотип ББ-221). При этом электрофоретические спектры тканей древесины, полученные на основе SSR-маркеров, обнаружили наличие у них одного или двух пиков. Это говорит о том, что оба компонента прививки являются диплоидами. Однако присутствие одного пика свидетельствует о том, что генотип является гомозиготным по конкретному локусу, а двух — гетерозиготным. В частности, по локусу L1.10 привой (карельская береза) оказался гомозиготным (188 п. н.), а подвой (береза повислая) — гетерозиготным (185/190 п. н.) (рис. 1). Диплоидный статус подтверждают также относительно равные высоты пиков электрофоретических вариантов в случае гетерозиготных тканей.

В то же время обнаружено, что ткани древесины подвоя (березы повислой) имеют некоторые генетические особенности, которые отразились в аллельном дисбалансе, в частности по локусу L2.2 (рис. 2А), и в значительном количестве минорных фракций с неустановленной детерминацией по локусу L10.1

Таблица 1

SSR-спектры тканей древесины подвоя и привоя дерева ПТ-982, полученного в результате прививки копулировкой

Образец	SSR-маркеры						
	L2.2	L1.10	L10.1	L022	L5.4	L7.3	L7.8
Подвой — береза повислая							
ББ-221/1	130/133	185/190	259	194/194	258/261	201/207	320
ББ-221/2	130/133	185/190	259	194/194	258/261	201/207	320
ББ-221/3	130/133	185/190	259	194/194	258/261	201/207	320
ББ-221/4	130/133	185/190	259	194/194	258/261	201/207	320
ББ-221/5	130/133	185/190	259	194/194	258/261	201/207	320
Привой — карельская береза							
КБ-337/1	131/133	188/188	259	194/198	231	194/205	320/338
КБ-337/2	131/133	188/188	259	194/198	231	194/205	320/338
КБ-337/3	131/133	188/188	259	194/198	231	194/205	320/338
КБ-337/4	131/133	188/188	259	194/198	231	194/205	320/338
КБ-337/5	131/133	188/188	259	194/198	231	194/205	320/338

Примечание. здесь, а также в таблице 2 и 3 электрофоретические варианты обозначены в соответствии с их размером, выраженном в н. о.

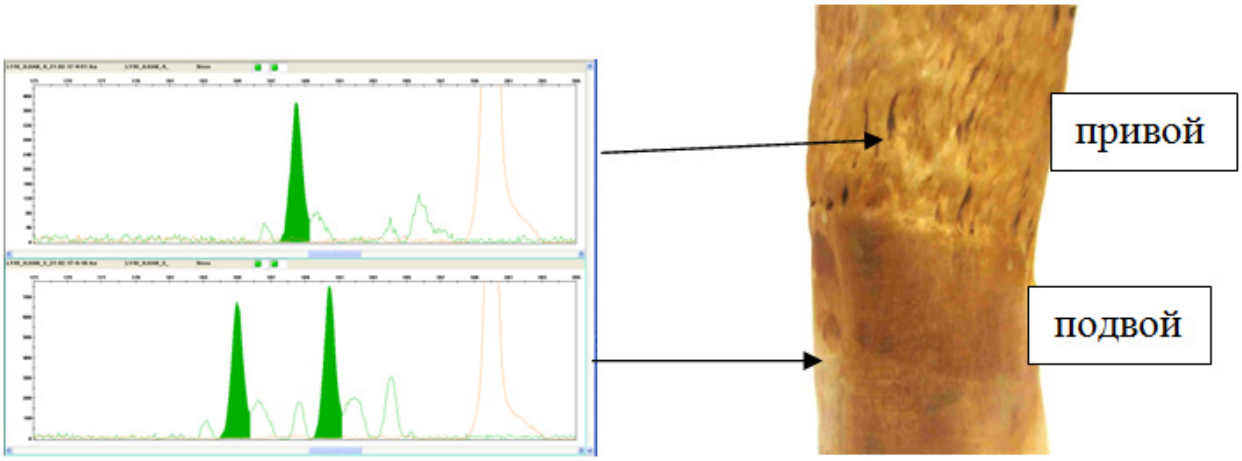

Рис. 1. SSR-спектры по маркеру L1.10 тканей древесины дерева ПТ-982, где привой — карельская береза, подвой — береза повислая

(рис. 2Б), что может указывать на наличие повышенного уровня миксоплоидии и геномной нестабильности. Однако генетический химеризм тканей не диагностировался, поскольку характер минорных спектров по локусам L7.3, L10.1, L022 был сходным с подвоем или привоем, а по L2.2, L1.10, L5.4 и L7.8 они не выявлялись.

В ходе анализа образцов, полученных при локальной трансплантации фрагментов коры (содержащих камбий) карельской березы на ствол березы пушистой, установлено, что донор и реципиент также сохраняли свои молекулярно-генетические профили. В таблице 2 приведены данные SSR-анализа тканей древесины дерева-реципинта березы пушистой (генотип БП-137), на стволе которого выполнена локальная трансплантация фрагмента коры карельской березы в качестве донора (генотип КБ-129).

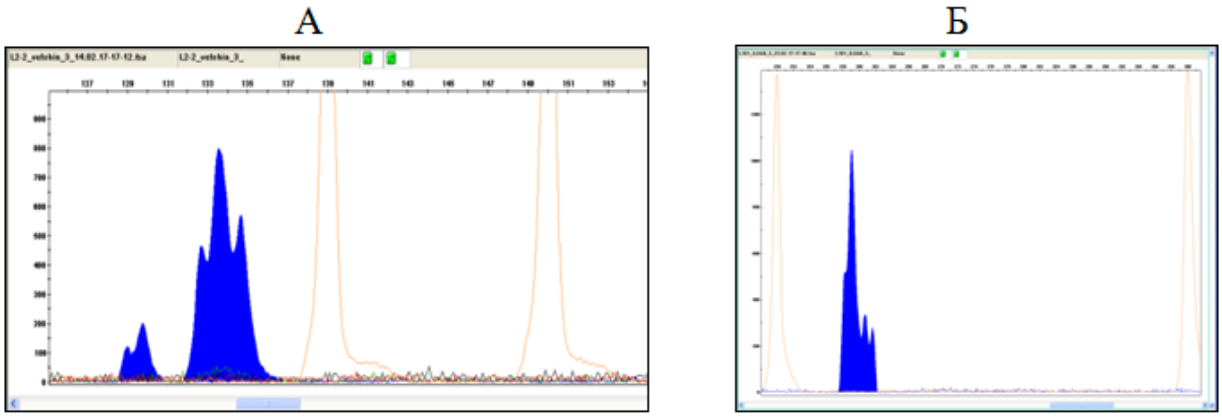

Рис. 2. SSR-спектры тканей древесины подвоя ББ-221 по маркерам L2.2 (А) и L10.1 (Б)

Таблица 2

SSR-спектры тканей древесины реципиента БП-137 и донора КБ-129

Образец	SSR-маркеры						
	L2.2	L1.10	L10.1	L022	L5.4	L7.3	L7.8
Донор – карельская береза							
КБ-129/1	131/137	175/188	255/259	185/194	231	204	294/319
КБ-129/2	131/137	175/188	255/259	185/194	231	204	294/319
КБ-129/3	131/137	175/188	255/259	185/194	231	204	294/319
КБ-129/4	131/137	175/188	255/259	185/194	231	204	294/319
КБ-129/5	131/137	175/188	255/259	185/194	231	204	294/319
Реципиент – береза пушистая							
БП-137/1	131/135/137	187/194/197/201	255/255/255/259	178/180/189/191	253	201/203/208/212	306
БП-137/2	131/135/137	187/194/197/201	255/259	178/180/189/191	253	201/203/208/212	306
БП-137/3	131/135/137	187/194/197/201	255/259	178/180/189/191	253	201/203/208/212	306
БП-137/4	131/135/137	187/194/197/201	255/259	178/180/189/191	253	201/203/208/212	306
БП-137/5	131/135/137	187/194/197/201	255/259	178/180/189/191	253	201/203/208/212	306

Как видно из таблицы 2, у донора (карельская береза) электрофоретические варианты не превышали двух по количеству, что соответствует его диплоидному статусу (2n). В то же время у реципиента диагностировалось до четырех вариантов одновременно, что указывало на тетраплоидный набор хромосом (4n), характерный для березы пушистой (рис. 3). Особенности электрофоретических спектров (кратные различия в высотах пиков) в случаях диагностики двух вариантов также подтверждали тетраплоидный статус реципиента [16].

Следует отметить, что в результате выполнения прививок видимые различия в ПЦР-спектрах тканей древесины реципиента и донора нами не обнаружены, о чем свидетельствовало отсутствие достоверного дисбаланса пиков электрофоретических вариантов по высоте и однотипном спектре выявляемых аллеломорфов. Генетический химеризм тканей образцов древесины донора или реципиента также достоверно не диагностировали ни по одному из изученных маркеров.

Анализ разнородных тканей, вновь сформировавшихся в результате проведения кольцевой (в виде пояса) трансплантации фрагмента коры карельской березы (донор) (генотип КБ-135) на ствол березы повислой (реципиент) (генотип ББ-234), когда у реципиента были «перерезаны» транспортные пути как нисхо-

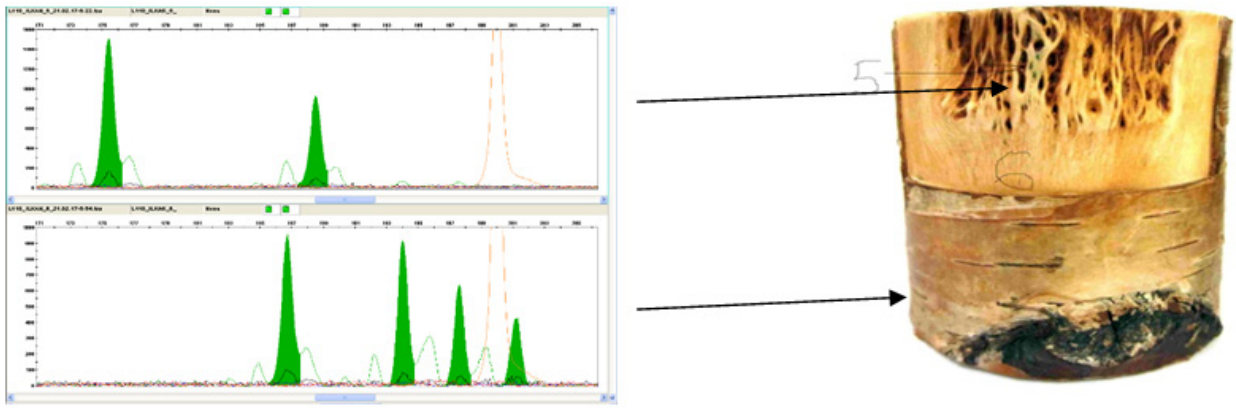

Рис. 3. SSR-спектр древесины донора — карельской березы КБ-129/1 и реципиента — березы пушистой БП-137/5 по маркеру L1.10

дящего тока от кроны к его собственной корневой системе, так и восходящего (от корневой системы к кроне), показал, что после срастания пересаженные ткани донора, располагаясь на стволе локально, продолжали развиваться и сохранять в древесине свои отличительные особенности. При этом структура окружающих тканей не изменялась, а в границах пересаженного участка наблюдался ежегодный радиальный прирост, который не смещался по стволу ни вверх, ни вниз. На рисунке 4 представлено изменение текстуры древесины на поперечных спилах ствола, сделанных послойно, начиная со средней части пересаженного участка коры карельской березы (донор) (спил I) и по мере удаления ее в сторону березы повислой (реципиента) (спил II), включая границу срастания донора и реципиента (спил III) и ниже ее, спил которого (IV) соответствует древесине реципиента.

Как видно из рисунка 4, на поперечных спилах ствола, сделанных в средней части кольцевой пересадки (спилы I и II), основную часть древесины занимают ткани с выраженной узорчатой текстурой, характерной фенотипу донора — карельской березе. Безузорчатые участки древесины расположены в центральной части спила в виде кольца (исходные ткани реципиента до трансплантации) и в секторе, топографически относящемуся к зоне соединения (стыка) краевых поверхностей тканей донора и реципиента. На спиле, соответствующему нижней границе срастания донора с реципиентом (спил III), текстура древесины носит смешанный характер. Последний из спилов (IV) соответствует древесине реципиента, поэтому узорчатость на нем отсутствует. Обращает на себя внимание, что образование узорчатой древесины происходит не в первый, а только на второй год после трансплантации. Это обусловлено тем, что для повышения эффективности срастания разнородных компонентов ткани коры карельской березы берутся не со ствола, а с боковых побегов (ветвей),

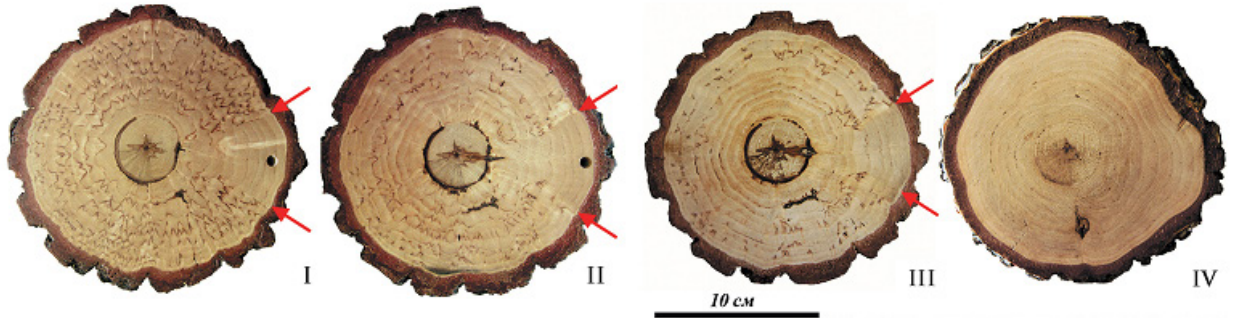

Рис. 4. Поперечные спилы, сделанные послойно в средней части кольцевой пересадки, отражающие изменение текстуры древесины, начиная со средней части (I–IV) места трансплантации фрагмента коры донора (карельской березы) и по мере удаления ее в сторону реципиента (березы повислой) (IV). Стрелками указаны краевые точки соединения древесины донора и реципиента, образовавшейся (в виде сектора) по мере увеличения диаметра ствола

имеющих ровную поверхность. Это способствует приживаемости тканей, но не препятствует формированию узорчатой древесины. Использование коры стволовой части карельской березы малопригодно для трансплантации, т. к. она имеет килевидные выросты на внутренней поверхности, ухудшающие регенерацию и срастание тканей.

Проведенный молекулярно-генетический анализ показал, что при кольцевой трансплантации все участки, относящиеся к «узорчатым» областям, вне зависимости от типа ткани (кора или древесина), оказались генетически идентичными и отличались от образцов безузорчатой ткани (рис. 5, табл. 3). Молекулярно-генетические профили древесины, соответствующие безузорчатым участкам (внутреннее кольцо, сектор, сформированный на месте соединения краевых поверхностей донора с реципиентом, ткани ниже места трансплантации) также были идентичными между собой. Это позволило сделать вывод о том, что все ткани с декоративной текстурой принадлежат донору — карельской березе, а с прямоволокнистой структурой — реципиенту — березе повислой.

Анализ уровня миксоплоидии тканей — производных донора и реципиента показал, что в ряде случаев данный показатель превышает норму (3–20%), характерную для вегетативных тканей покрытосеменных древесных растений [17]. При этом доля гетероплоидных клеток в тканях древесины и коры отдельных образцов варьировала от средних до высоких значений (дисбаланс аллелей в различных хромосомах составил от 22,2 до 78,6%), что связано, по всей вероятности, с утратой одной из хромосом. Количественные показатели уровня миксоплоидии для тканей — производных донора и реципиента представлены на

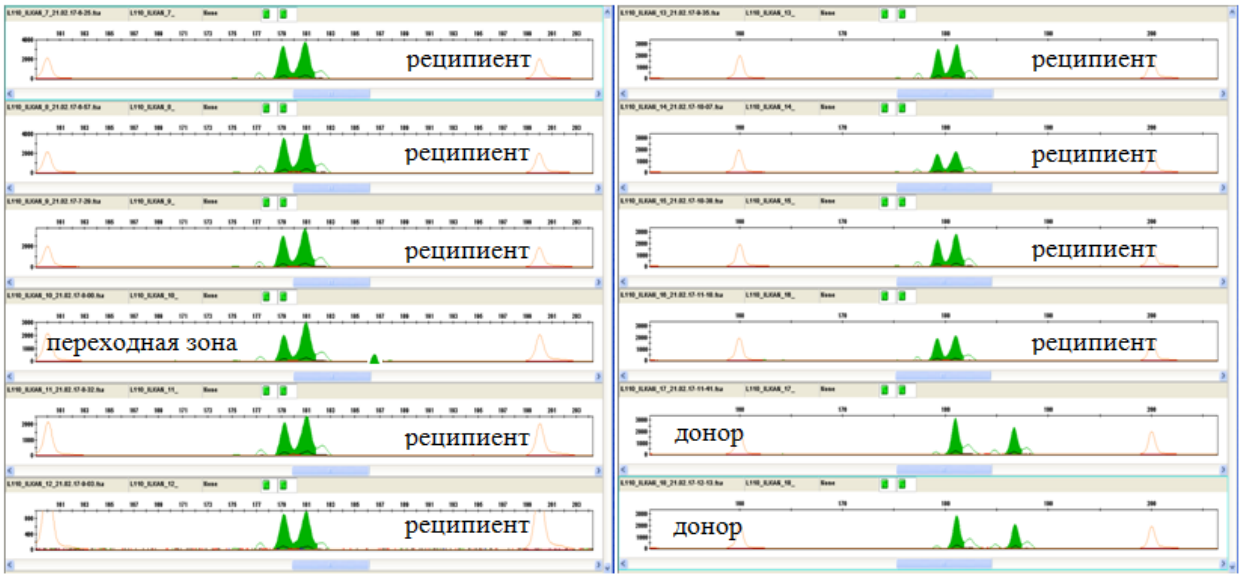

Рис. 5. SSR-спектры тканей древесины и коры донора КБ-135 и реципиента ББ-234 (маркер L1.10). 1–3, 5–10 — безузорчатые участки (реципиент); 4 — сектор, сформированный на месте соединения краевых поверхностей донора с реципиентом; 11 — узорчатый участок (донор, кора); 12 — узорчатый участок (донор, древесина)

Таблица 3

SSR-спектры тканей древесины и коры реципиента ББ-234 и донора КБ-135

Образец	Маркер						
	L2.2	L1.10	L10.1	L022	L5.4	L7.3	L7.8
ББ-234	133	179/181	259	185/191	251/255	195/209	298/298
КБ-135	133	179/187	259	194/209	253/253	204/204	299/302

рисунке 6. Гомозиготы считались неинформативными случаями.

Как видно из рисунка 6, по отдельным маркерам в тканях древесины узорчатых и безузорчатых образцов диагностировался высокий уровень аберрантных клеток (аллельный дисбаланс до 78,4 и 78,6% соответственно), что, по всей вероятности, обусловлено физиологическими процессами, произошедшими в камбиальных клетках в период регенерации и срастания генетически разнородных тканей. Кроме того, в тканях отдельных образцов древесины и коры реципиента, соответствующих зоне срастания компонентов (маркер L5.4.), уровень гетероплоидных клеток превысил 20%.

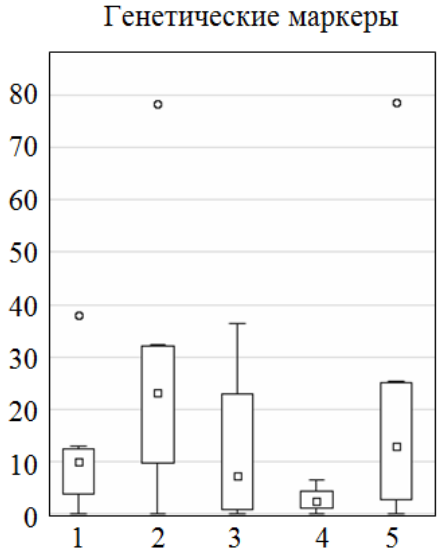

Рис. 6. Уровень миксоплоидии тканей на основании расчета данных потери гетерозиготности по маркерам у донора (карельская береза, КБ-135): 1 — L1.10, 2 — L5.4, 3 — L7.3 и у реципиента (береза повислая, ББ-234): 4 — L1.10 и 5 — L7.8

Следует также отметить, что в переходных (реципиент/донор) и пограничных (прилежащих) участках древесины достоверно диагностировался химеризм тканей, что выражалось в одновременном наличии вариантов аллелей, характерных обоим генотипам. Кроме того, в ряде образцов древесины реципиента и донора выявлена микросателлитная нестабильность, проявляющаяся в виде появления дополнительных атипичных (с редуцированным мотивом в составе повторяющейся ДНК) аллеломорфов в SSR-спектрах.

Заключение

Проведенная молекулярно-генетическая оценка образцов древесины, полученных в ходе прививки копулировкой карельской березы на березу повислую или березу пушистую, показала отсутствие существенных изменений в выявляемых аллельных вариантах в SSR-спектре вновь образуемых тканей подвоя и привоя. В то же время в зоне, соответствующей месту прививки, в ряде случаев отмечали повышение уровня геномной нестабильности. При проведении локальной трансплантации тканей коры образуемая древесина (на основании генетических данных) является исключительно производной донора и не содержит наследственного материала реципиента (отсутствие химеризма), за исключением зоны срастания генетически разнородных тканей, где образование раневых тканей осуществляется за счет латеральной меристемы обоих компонентов. Уровень генетических аберраций, возникающих в камбиальных клетках, был более высоким в случае кольцевой трансплантации коры, когда «перерезаются» все нисходящие и восходящие транспортные пути вдоль оси ствола реципиента по его окружности. В целом после выполнения прививки (или локальной трансплантации тканей как разновидности прививки) привой (донор) и подвой (реципиент) сохраняли не только присущие им фенотипические, но и генотипические особенности, четко различаясь по спектрам аллельного разнообразия, что выступает еще одним важным аргументом в пользу точки зрения о том, что узорчатая текстура древесины карельской березы является генетически детерминированным признаком.

Финансовое обеспечение исследований осуществлялось при частичной поддержки грантов Б07М-077, БРФФИ № Б17-63, а также из средств федерального бюджета Российской Федерации на выполнение государственного задания Карельского научного центра РАН (Институт леса КарНЦ РАН — № FMEN-2021-0018, Институт биологии КарНЦ РАН — № FMEN-2022-0004).

Список использованных источников

1. Новицкая, Л. Л. Карельская береза: механизмы роста и развития структурных анома-

лий // Л. Л. Новицкая. – Петрозаводск: Verso, 2008. – 144 с.

2. Курносов, Г. А. Ямчатость стебля как типичное проявление аномального строения стебля древесных растений / Г. А. Курносов // Лесной вестник. – 2000. – № 6. – С. 151–155.

3. Ветчинникова, Л. В. Карельская береза: биологические особенности, динамика ресурсов и воспроизводство // Л. В. Ветчинникова, А. Ф. Титов, Т. Ю. Кузнецова. – Петрозаводск: КарНЦ РАН, 2013. – 312 с.

4. Chapter 4 — Phytoplasma diseases of trees / C. Marcone [et al.] // Forest Microbiology: Forest Microbiology / eds. F. O. Asiegbu, A. Kovalchuk. – Academic Press. – 2023. – Vol. 3. – P. 99–120. https://doi.org/10.1016/B978-0-443-18694-3.00008-0.

5. Ветчинникова, Л. В. Карельская береза: важнейшие результаты и перспективы исследований [монография] / Л. В. Ветчинникова, А. Ф. Титов. – Петрозаводск: КарНЦ РАН, 2021. – 243 с.

6. Ветчинникова, Л. В. Особенности структуры популяций карельской березы / Л. В. Ветчинникова, А. Ф. Титов // Успехи современной биологии. – 2020. – Т. 140, № 6. – С. 601–615.

7. Соколов, Н. О. Карельская береза / Н. О. Соколов. – Петрозаводск: Гос. изд-во Карело-Финской ССР, 1950. – 116 с.

8. Любавская, А. Я. Карельская береза / А. Я. Любавская. – М.: Лесная промышленность, 1978. – 158 с.

9. Hagqvist, R. Visakoivun kasvatus ja käyttö / R. Hagqvist, A. Mikkola. – Metsäkustannus Oy, 2008. – 168 p.

10. Косиченко, Н. Е. Структурные аспекты гормональной обусловленности нарушения активности камбия / Н. Е. Косиченко, С. В. Щетинкин // Проблемы физиологии и биохимии древесных растений: Тез. докл. Всесоюз. конф. – Красноярск. – 1982. – С. 124.

11. Кирьянов, П. С. Поиск селективных маркеров, ассоциированных с аномальным ксилогенезом карельской березы (*Betula pendula* Roth. var. *carelica* Merkl.), с использованием высокопроизводительного секвенирования / П. С. Кирьянов // Труды БГТУ. Сер. 1, Лесное хозяйство, природопользование и переработка возобновляемых ресурсов. – Минск: БГТУ. – 2020. – № 2 (234). – С. 79–85.

12. Meier-Dinkel, A. Micropropagation of Birches (Betula spp.) / A. Meier-Dinkel // High-Tech and Micropropagation II / ed. Y.P.S. Bajaj. – Berlin, Heidelberg: Springer. – 1992. – P. 40–81.

13. Ермаков, В. И. Внутри- и межвидовая трансплантация коры березы и ее регенерация при повреждении [монография] / В. И. Ермаков, Л. Л. Новицкая, Л. В. Ветчинникова. – Петрозаводск: КарНЦ АН СССР, 1991. – 184 с.

14. Kulju, K. K. M. Twenty-three microsatellite primer pairs for Betula pendula (Betulaceae) / K. K. M. Kulju, M. Pekkinen, S. Varvio // Molecular Ecology Notes. – 2004. – Vol. 4, № 3. – P. 471–473. https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2004.00704.x.

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

16. Баранов, О. Ю. Использование молекулярно-генетических маркеров для анализа плоидности осины и березы / О. Ю. Баранов, В. Балюцкас // Проблемы лесоведения и лесоводства: Сборник научных трудов ИЛ НАН Беларуси. – Вып. 69. – Гомель: ИЛ НАН Беларуси. – 2009. – С. 689–696.

17. Машкина, О. С. Длительное культивирование в условиях *in vitro* как один из способов сохранения представителей ценного генофонда карельской березы / О. С. Машкина, Т. М. Табацкая // Достижения и проблемы лесной генетики и селекции: к 40-летию НИИЛГиС / Агентство лесного хозяйства Российской Федерации, ФГУП «Научно-исследовательский институт лесной генетики и селекции». – Воронеж: Издательство Истоки. – 2010. – С. 30–51.

S. V. Panteleev[1], L. V. Vetchinnikova[2], A. F. Titov[3], P. S. Kiryanov[1], O. Yu. Baranov[4]

MOLECULAR GENETIC ANALYSIS OF WOOD AND BARK OF DIFFERENT BIRCH SPECIES OBTAINED DURING THE COPULATION GRAFTINGS AND TRANSPLANTATION OF BARK AREAS CONTAINING CAMBIUM

[1]Forest Research Institute of the National Academy of Sciences of Belarus
71 Proletarskaya St., 246050 Gomel, the Republic of Belarus
e-mail: stasikdesu@mail.ru
[2]Forest Research Institute of the Karelian Research Centre of the Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk, Russia
[3]Institute of Biology of the Karelian Research Centre of the Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk, Russia
[4]National Academy of Sciences of Belarus
66 Nezavisimosti Ave., 220072 Minsk, the Republic of Belarus

Microsatellite analysis was applied to the trunk tissue fragments of different birch species generated through whip grafting or local bark transplantation (in the form of a patch or a ring). The scion (donor) was the bark tissue of curly birch *Betula pendula* Roth var. *carelica* (Mercklin) Hamet-Ahti, which has veined wood highly contrasting with the common (straight-grained) wood of the rootstock (recipient) — silver birch *Betula pendula* Roth and downy birch *Betula pubescens* Ehrh. Hardly any noticeable changes were established in the scion and rootstock wood. In the case of local bark transplantation, the newly formed wood was also the donor derivative, and it did not contain the recipient's hereditary material (no genetic chimerism), except for the fusion area of genetically heterogeneous tissues, where the wound surface is formed due to the lateral meristem of both components. At the same time, we found that the amount of aberrant cells in such areas are higher in the case of bark ring transplantation where all the ascending and descending transport pathways along the recipient's trunk axis are severed all around the trunk circumference. It is concluded that after whip grafting (or local bark transplantation), the scion (donor) and the rootstock (recipient) retain their specific phenotypic as well as genotypic traits, differing clearly in allelic diversity spectra, which is another important argument in favor of the opinion that the figured pattern in curly birch wood is a genetically determined trait.

Keywords: SSR markers, curly birch, *Betula pendula* Roth var. *carelica* (Mercklin) Hamet-Ahti, silver birch, *Betula pendula* Roth, downy birch, *Betula pubescens* Ehrh., grafting, tissue transplantation, pattern wood, genotypes.

Дата поступления в редакцию: 23 сентября 2024 г.

УДК 577.212.3:575.167

А. Н. Заинчковская[1], Е. А. Фомина[1], А. В. Ярошевич[2], А. А. Зубкович[2], О. Ю. Урбанович[1]

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ХОЛОДОВОГО СТРЕССА НА УРОВЕНЬ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ *HvCBF14* И *HvCOR14b* У СОРТООБРАЗЦОВ ОЗИМОГО ЯЧМЕНЯ В МОДЕЛИРУЕМЫХ УСЛОВИЯХ

[1]Государственное научное учреждение
«Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси»
Республика Беларусь, 220141, г. Минск, ул. Ф. Скорины, 34
e-mail: O.Urbanovich@igc.by
[2]Республиканское унитарное предприятие
«Научно-практический центр Национальной академии наук Беларуси по земледелию»
Республика Беларусь, 222160, г. Жодино, ул. Тимирязева, 1

Исследовано изменение уровня экспрессии генов *HvCBF14* и *HvCOR14b* методом РТ-ПЦР в условиях холодового стресса у устойчивых к холоду сорта Буслик, сортообразцов 990829, 990668, 989159, а также чувствительного к холоду сортообразца 9201077. Наибольшее увеличение уровня экспрессии гена *HvCBF14* в 69 раз было выявлено для сортообразца 990829 через 2 ч при наступлении условий –4 °С. Наименьшее увеличение уровня экспрессии указанного гена в 4 раза установлено для сортообразца 990668 через 2 ч при наступлении условий +4 °С. Для гена *HvCOR14b* наибольшее увеличение уровня его экспрессии выявлено для сортообразца 9201077 через 2 ч при наступлении условий –2 °С — в 1 236 раз, а наименьшее — для сорта Буслик — через 2 ч при наступлении условий +4 °С — в 7 раз. Показано влияние генотипа ячменя на уровень экспрессии генов *HvCBF14* и *HvCOR14b* при воздействии холодового стресса. Увеличение экспрессии данных генов отмечено после наступления условий –4 °С у устойчивых к холоду образцов. Уровень экспрессии гена *HvCBF14* в целом ниже, чем гена *HvCOR14b*.

Ключевые слова: абиотический стресс, транскрипционные факторы, озимый ячмень, ген *HvCBF14*, ген *HvCOR14b*, холодовой стресс.

Для цитирования: Изучение влияния холодового стресса на уровень экспрессии генов *HvCBF14* и *HvCOR14b* у сортообразцов озимого ячменя в моделируемых условиях / А. Н. Заинчковская, Е. А. Фомина, А. В. Ярошевич [и др.] // Молекулярная и прикладная генетика: сб. науч. тр. / Ин-т генетики и цитологии НАН Беларуси; редкол.: А. В. Кильчевский (гл. ред.) [и др.]. – Минск, 2024. – Т. 37. – С. 26–35.

Введение

Ячмень (*Hordeum vulgare*) является модельным объектом для изучения реакций растений на изменение климатических условий [1]. Данная культура часто классифицируется на основе типа ее развития на озимый, яровой и факультативный. Озимый ячмень требует яровизации и поэтому высевается осенью [2]. Хорошая приспособляемость к различным агроклиматическим условиям способствовала распространению выращивания ячменя в климатических зонах с большими вариациями температурного режима в течение вегетационного периода. Сегодня по объемам производства он входит в четверку ведущих зерновых культур в мире [3]. Ячмень используется для производства пищевых продуктов, в пивоварении и в качестве корма для животных [4].

Посевные площади ячменя в Республике Беларусь, по данным на июль 2024 г., составляют 438,6 тыс. га — 18,7% от посевных площадей, занятых под зерновые и зернобобовые, и 7,6% от всех посевных площадей в стране. Следует отметить, что в последние годы на территории Республики Беларусь происходит постоянное увеличение посевных площадей озимого ячменя (в 2019 г. — 12 тыс. га, в 2020 г. — 18 тыс. га, в 2021 г. — 28 тыс. га, в 2022 г. — 60 тыс. га, в 2023 г. — 150 тыс. га) [5].

Новые методы орошения, массовое использование удобрений и средств защиты растений, механизация, селекция сельскохозяйственных культур и внедрение улучшенных сортов стали определяющими факторами в наблюдаемом повышении производительности данной культуры в мире. Однако экстремальные погодные условия, сокращение пахотных земель и растущие потребности в удобрениях и поливе подвергают выращивание культур на полях стрессовым условиям, что существенно влияет на сельскохозяйственное производство. Создание новых сортов сельскохозяйственных культур с более высокой адаптацией к колебаниям погодных условий будет способствовать обеспечению глобальной продовольственной безопасности [6]. Низкая температура является одним из основных экологических стрессов при возделывании ячменя, который может приводить к обезвоживанию клеток растений, лизису хлоропластов и увеличению жесткости клеточной мембраны, тем самым ограничивая фотосинтез и метаболизм углеводов [7].

Холодовой стресс ограничивает географическое распространение растений и влияет на их рост, развитие и урожайность. Растения как сидячие организмы выработали сложные биохимические и физиологические механизмы для адаптации к холодовому стрессу. Холодовая акклиматизация является сложно наследуемым признаком у злаков, контролируемым несколькими генетическими регуляторными сетями. Молекулярные и генетические исследования выявили ряд факторов транскрипции, выступающих в качестве ключевых регуляторов транскриптомной перестройки, которая приводит к холодовой акклиматизации [8]. Наиболее изученным семейством факторов транскрипции (TF), ответственным за холодовую закалку и морозостойкость, является мультигенное семейство CBF/DREB1. Эти TF принадлежат к суперсемейству AP2/ERF (фактор, реагирующий на APETALA2/этилен) и способны связываться с CRT/DRE (элементы, реагирующие на С-повтор/дегидратацию) в промоторной области нескольких генов, индуцируемых холодом. Они быстро реагируют на холод, демонстрируя временную экспрессию в течение нескольких часов. *CBF* гены ячменя были классифицированы на три филогенетические группы: HvCBFI, HvCBFIII и HvCBFIV. Семь *CBF* генов группы HvCBFI широко распространены по всему геному, в то время как 13 *CBF* генов групп HvCBFIII и HvCBFIV входят в состав локуса *FR-H2* и организованны в один кластер [9], который, в свою очередь, разделен на проксимальную (*HvCBF* 2, 4 и 9), центральную (*HvCBF* 3, 12, 13, 14, 15, 16) и дистальную (*HvCBF* 6 и 10) части. *CBF* гены локуса *FR-H2* фланкированы некодирующими последовательностями, обогащенными множественными повторяющимися элементами [6]. Согласно последним исследованиям, среди 13 *CBF* генов локуса *FR-H2* основной вклад в ответ на холодовой стресс вносят гены *HvCBF14*, *HvCBF2a* и *HvCBF4b* [10]. У ячменя экспрессия *CBF* генов является очень важным фактором для индукции генов холодочувствительности (*COR*), таких как *COR14b* и *DHN5*. Этот каскад является инициирующим событием холодовой акклиматизации растений, при котором происходит перестройка метаболизма растений и повышение их морозостойкости. Индукция *CBF* генов, в свою очередь, опосредована конститутивно экспрессируемыми белками ICE, которые активируются холодом и способны индуцировать экспрессию *CBF* [11].

Поскольку *CBF14* является основным геном, который активируется при холодовом воздействии и может регулировать другие гены *CBF*, а также активировать экспрессию одного из генов холодочувствительности *COR14b*, целью нашего исследования было изучение влияния холодового стресса на изменение уровня экспрессии генов *HvCBF14* и *HvCOR14b* озимого ячменя белорусской селекции в моделируемых условиях.

Материалы и методы

Растительный материал и условия выращивания растений. Для исследования были взяты устойчивые к холоду по результатам полевых испытаний сорт Буслик, сортообразцы Олимп × Синдирелла (селекционный номер — 990829), Тереза × Титус (селекционный номер — 990668), Наоми × Титус (селекционный номер — 989159), а также чувствительный к холоду сортообразец (Karakan × Laverda) × (Тимофей × Laverda) (селекционный номер — 9201077). Данные образцы были переданы отделом ячменя РУП

«Научно-практический центр НАН Беларуси по земледелию».

Условия выращивания. Растения были выращены при определенном режиме в климатической камере Pol-Eko-Aparatura KK1200Fit. 1 стадия — 25 дней при +16/+10 °C (12 ч день/12 ч ночь), 2 стадия — 5 дней при +10/+4 °C (12 ч день/12 ч ночь), 3 стадия — +4 °C (48 ч ночь), 4 стадия — +2 °C (60 ч ночь), 5 стадия — –2 °C (24 ч ночь), 6 стадия — 5 дней при +2 °C (12 ч ночь)/–2 °C (12 ч ночь), 7 стадия — –4 °C (24 ч ночь) — данный режим подобран в соответствии с условиями, максимально приближенными к тем, которым подвергаются растения в осенне-зимний период в Республике Беларусь.

Уровень экспрессии указанных генов измеряли на стадиях 3 (+4 °C), 5 (–2 °C), 6 (+2/–2 °C), 7 (–4 °C) через 2 и 24 ч после наступления каждой из них.

Получение препаратов РНК, синтез кДНК, проведение ПЦР в режиме реального времени, а также статистическая обработка данных проводилась по методикам, представленным в исследованиях А. Н. Заинчковской с соавторами [12, 13].

Последовательности праймеров для генов *HvCBF14*, *HvCOR14b* и референсного гена, кодирующего первичную последовательность актина, приведены в таблице 1.

Таблица 1

Нуклеотидные последовательности праймеров, использованных для анализа экспрессии генов *HvCBF14* и *HvCOR14b*

Название маркера	Последовательность праймеров 5'-3'	T_m	Ожидаемый размер, п. н.
r_Hv_Cor14b	F TTGAGGATGTGAGCAAATGAG R TACATCGTCAATGACGAGACC	60	103
r_Hv_CBF14	F GCTCCACTCTCCAGCATCCA R GTGCCCATCACACGGGGA	64	145
Hv_ACT	F GGCGCAGTCCAAGAGAGGTATC R CAACACAGGGTGCTCCTCGGG	142	56–64

Результаты и обсуждение

В связи с важностью генов *HvCBF14* и *HvCOR14b* в ответной реакции на воздействие низких температур в нашем исследовании было изучено изменение показателей уровня их экспрессии методом ПЦР в режиме реального времени в моделируемых условиях холодового стресса у устойчивого к холоду по результатам полевых испытаний сорта Буслик, сортообразцов 990829, 990668, 989159, а также чувствительного к холоду сортообразца 9201077. Уровень экспрессии указанных генов измеряли на стадиях 3, 5, 6, 7, указанных в разделе «Материалы и методы», через 2 и 24 ч после наступления каждой из них.

При изучении показателей уровня экспрессии генов *HvCBF14* и *HvCOR14b* нами были обнаружены значительные различия в значениях для каждого из исследуемых образцов. Так, для сорта Буслик (рис. 1) были показаны статистически значимые положительные значения уровня экспрессии исследуемых генов и их постепенное увеличение по мере изменения температурных режимов согласно этапам моделируемых условий холодового стресса. Наибольшие увеличения уровня экспрессии гена *HvCOR14b* были показаны через 2 и 24 ч после наступления стадии моделируемых условий –4 °C и составили 134 и 187 раз соответственно. На протяжении всего эксперимента наблюдалось увеличение уровня экспрессии как гена *HvCBF14*, так и *HvCOR14b*, однако после 24 ч при наступлении этапа +2 °C/–2 °C было показано небольшое снижение уровня экспрессии с 34 до 11 раз для гена *HvCBF14* и с 116 раз до 89 для гена *HvCOR14b*, после чего следовало дальнейшее увеличение на последующих этапах моделируемых условий холодового стресса.

Анализ уровня экспрессии указанных генов у сортообразца 990829 продемонстрировал незначительные колебания в изменении исследуемых показателей по сравнению с сортом Буслик как для гена *HvCBF14*, так

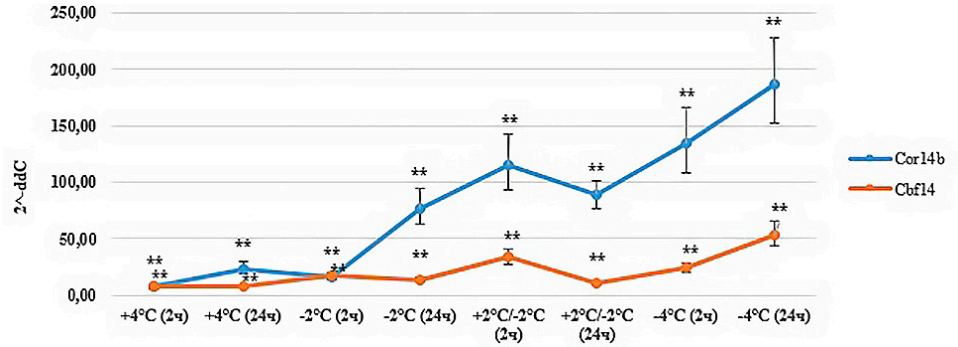

Рис. 1. Относительный уровень экспрессии генов *HvCBF14* и *HvCOR14b* у сорта озимого ячменя Буслик в моделируемых условиях холодового стресса. На диаграмме представлены средние значения и стандартные отклонения. Уровень экспрессии генов *HvCBF14* и *HvCOR14b* у растений, не подвергающихся холодовому стрессу, равен 1. P <0,01 (**) по сравнению с контролем

и для гена *HvCOR14b* (рис. 2). Исследование уровня экспрессии гена *HvCBF14* у данного сортообразца показало, что на протяжении всех этапов моделируемых условий холодового стресса показатели уровня его экспрессии были положительными и статистически значимыми. Наименьшие значения уровня экспрессии для данного гена были показаны на первом измеряемом этапе моделируемого эксперимента, т. е. через 2 ч при +4 °C, где было показано увеличение в 5 раз по сравнению с контролем. Для *HvCOR14b* на первых этапах моделируемых условий наблюдалось отсутствие экспрессии. В целом у сортообразца 990829 было выявлено два этапа моделирумых условий, при которых показатели уровня экспрессии гена *HvCBF14* были наивысшими, а именно через 2 ч при –2 и –4 °C, и при наступлении данных условий экспрессия увеличилась в 59 и 69 раз соответственно. При этом наблюдалось снижение уровня экспрессии от 23 раз при –2 °C через 24 ч до 13 и 15 раз при +2/–2 °C через 2 и 24 ч соответственно. Как указывалось выше, на первых измеряемых этапах эксперимента экспрессия гена *HvCOR14b* не наблюдалась, однако через 24 ч после наступления этапа –2 °C она увеличилась в 24 раза. На дальнейшем этапе моделируемых условий холодового стресса через 2 ч при +2/–2 °C снова было показано отсутствие экспрессии и последующее увеличение уровня экспрессии в 14 раз при +2/–2 °C через 24 ч. Наибольшее увеличение уровня экспрессии гена *HvCOR14b* у данного сортообразца (в 58 и 430 раз) было зарегистрировано после наступления этапа моделируемого эксперимента –4 °C через 2 и 24 ч соответственно.

Результаты изменения уровня экспрессии генов *HvCBF14* и *HvCOR14b* у сортообразца 990668 приведены на рисунке 3. Показатели изменения уровня экспрессии гена *HvCBF14* у данного сортообразца были статистически

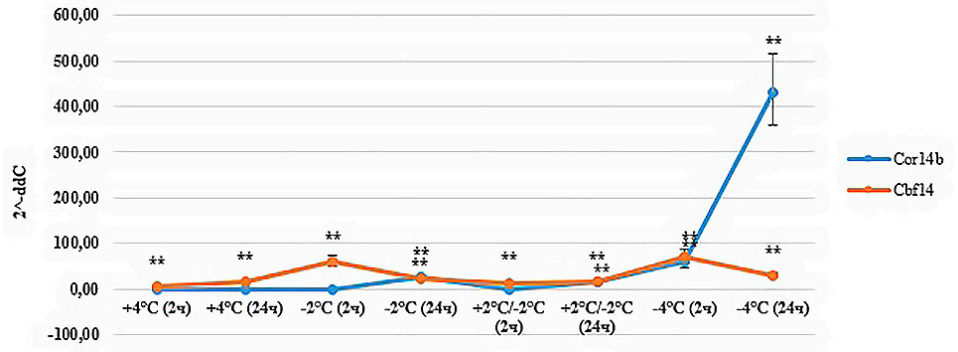

Рис. 2. Относительный уровень экспрессии генов *HvCBF14* и *HvCOR14b* у сортообразца озимого ячменя 990829 в моделируемых условиях холодового стресса. На диаграмме представлены средние значения и стандартные отклонения. Уровень экспрессии генов *HvCBF14* и *HvCOR14b* у растений, не подвергающихся холодовому стрессу, равен 1. P <0,01 (**) по сравнению с контролем

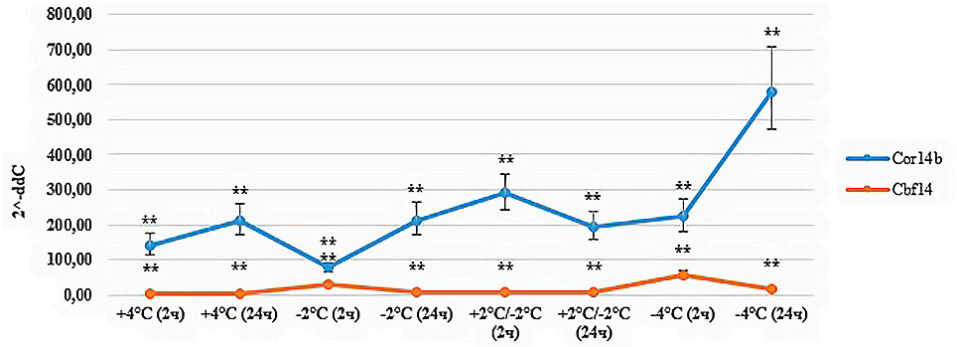

Рис. 3. Относительный уровень экспрессии генов *HvCBF14* и *HvCOR14b* у сортообразца озимого ячменя 990668 в моделируемых условиях холодового стресса. На диаграмме представлены средние значения и стандартные отклонения. Уровень экспрессии генов *HvCBF14* и *HvCOR14b* у растений, не подвергающихся холодовому стрессу, равен 1. P <0,01 (**) по сравнению с контролем

значимы и имели положительные значения на протяжении всех этапов моделирования условий холодового стресса. Самые низкие значения уровня экспрессии наблюдались через 2 и 24 ч после наступления этапа +4 °C, где было показано увеличение экспрессии в 4 и 5 раз соответственно. Близкие по значению показатели также были выявлены через 2 и 24 ч после наступления этапа +2/–2 °C, где уровень экспрессии указанного гена увеличивался в 6 и 5 раз соответственно. Самый высокий уровень экспрессии гена *HvCBF14* был обнаружен через 2 ч при переходе на этапы с температурными режимами –2 и –4 °C, где его показатели достигали значений в 31 и 56 раз соответственно. При исследовании уровня экспрессии гена *HvCOR14b* у сортообразца 990668 наблюдались высокие значения, начиная с первых этапов эксперимента, и уже при +4 °C через 2 и 24 ч увеличение экспрессии составило 142 и 212 раз соответственно. На следующем этапе при –2 °C через 2 ч для указанного сортообразца было показано снижение значений уровня экспрессии гена *HvCOR14b* до 76 раз. В дальнейшем, уже через 24 ч на данном этапе уровень экспрессии имел значение в 213 раз. Максимальное значение уровня экспрессии указанного гена в 580 раз было установлено через 24 ч после наступления этапа моделируемых условий холодового стресса –4 °C.

Результаты изменения уровня экспрессии генов *HvCBF14* и *HvCOR14b* у сортообразца 989159 приведены на рисунке 4. При анализе уровня экспрессии гена *HvCBF14* для указанного сортообразца в основном было показано незначительное колебание уровня экспрессии данного гена на протяжении всех этапов моделируемых условий холодового стресса. Наименьшие значения уровня экспрессии исследуемого гена были выявлены при наступлении этапа +4 °C через 2 и 24 ч, где было

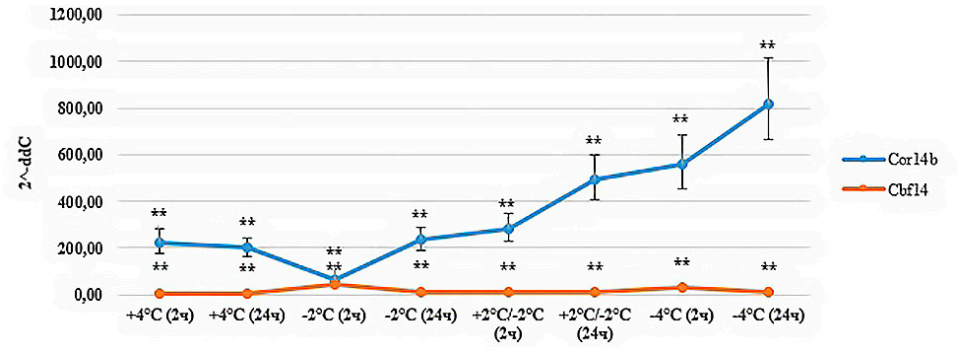

Рис. 4. Относительный уровень экспрессии генов *HvCBF14* и *HvCOR14b* у сортообразца озимого ячменя 989159 в моделируемых условиях холодового стресса. На диаграмме представлены средние значения и стандартные отклонения. Уровень экспрессии генов *HvCBF14* и *HvCOR14b* у растений, не подвергающихся холодовому стрессу, равен 1. P <0,01 (**) по сравнению с контролем

показано увеличение экспрессии в 8 и 7 раз соответственно. Наибольшие показатели уровня экспрессии гена *HvCBF14* наблюдались через 2 ч после наступления моделируемых этапов –2 и –4 °С, где их значения возросли до 46 и 32 раз соответственно. Исследование уровня экспрессии гена *HvCOR14b* у данного сортообразца выявило достаточно высокие статистически значимые показатели данного признака, которые за исключением этапа –2 °С через 2 ч постепенно возрастали на всем протяжении моделируемых условий холодового стресса. Наибольшие значения уровня экспрессии указанного гена наблюдались после наступления этапа моделируемого эксперимента –4 °С через 2 и 24 ч и составили 561 и 821 раз соответственно.

Показатели уровня экспрессии генов *HvCBF14* и *HvCOR14b* у сортообразца 9201077 были статистически значимы, за исключением гена *HvCOR14b* при –4 °С через 2 ч, и имели большие различия (рис. 5). Так, при изучении уровня экспрессии гена *HvCBF14* нами было выявлено два основных пика увеличения показателей уровня его экспрессии через 2 ч после наступления этапов моделируемых условий холодового стресса –2 и –4 °С и составили 26 и 28 раз соответственно. Наименьшие значения уровня экспрессии гена *HvCBF14* для указанного сортообразца были показаны через 2 и 24 ч после наступления этапа +4 °С, и их значения составили 4 и 6 раз соответственно. Близкие значения наблюдались и через 2 и 24 ч во время этапа +2/–2 °С, где показатели уровня экспрессии данного гена составили 7 и 6 раз соответственно. Анализ уровня экспрессии гена *HvCOR14b* для указанного сортообразца показал значительные отличия, а также довольно высокие значения уровня его экспрессии на большинстве моделируемых этапов холодового стресса по сравнению с другими исследуемыми сортообразцами. Уже на начальных этапах при +4 °С через 2 и 24 ч уровень экспрессии данного гена достигал 166 и 443 раза соответственно. Самый высокий показатель уровня экспрессии для гена *HvCOR14b* у сортообразца 9201077 наблюдался после наступления этапа эксперимента –2 °С через 2 ч, где его показатель достиг значения в 1 236 раз. А после перехода на последующий этап при –4 °С через 2 ч уровень экспрессии не наблюдался вовсе. Вероятно, такие различия в уровне экспрессии указанного гена на последних двух этапах моделируемых условий холодового стресса у чувствительного к холоду сортообразца 9201077 и указанных выше устойчивых к холоду по результатам полевых испытаний сортообразцов и сорта Буслик лежат в основе фенотипических отличий исследованных нами образцов по данному признаку.

Таким образом, среди исследованных образцов наибольшее увеличение уровня экспрессии гена *HvCBF14* в 69 раз было выявлено для сортообразца 990829 через 2 ч при наступлении условий –4 °С. Наименьшее увеличение уровня экспрессии указанного гена в 4 раза было установлено для сортообразца 990668 через 2 ч при наступлении условий +4 °С. Для гена *HvCOR14b* наибольшее увеличение уровня его экспрессии было выявлено для сортообразца 9201077 через 2 ч при наступлении условий –2 °С и было равно 1 236 раз,

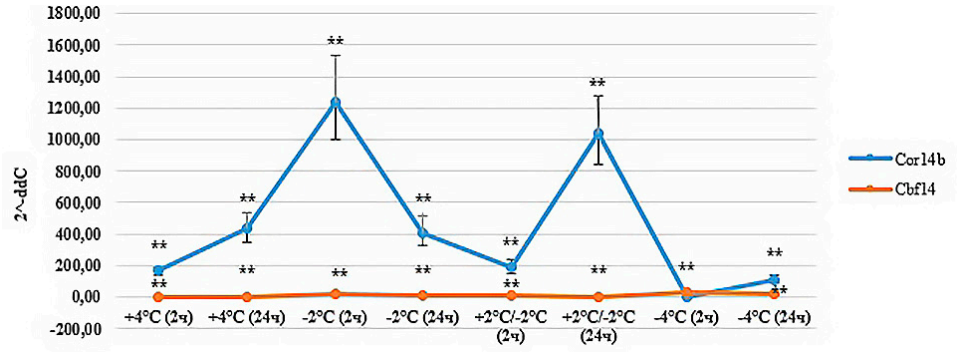

Рис. 5. Относительный уровень экспрессии генов *HvCBF14* и *HvCOR14b* у сортообразца озимого ячменя 9201077 в моделируемых условиях холодового стресса. На диаграмме представлены средние значения и стандартные отклонения. Уровень экспрессии генов *HvCBF14* и *HvCOR14b* у растений, не подвергающихся холодовому стрессу, равен 1. P <0,01 (**) по сравнению с контролем

а наименьшее — для сорта Буслик — через 2 ч при наступлении условий +4 °С в 7 раз. У сортообразца 990829 через 2 и 24 ч после наступления условий +4 °С, через 2 ч после наступления условий –2 и +2/–2 °С, так же как и у сортообразца 9201077 через 2 ч после наступления условий –4 °С, было показано отсутствие экспрессии указанного гена. Из изложенного выше можно сделать вывод о том, что у устойчивых к холоду сортообразцов наблюдается значительное накопление транскрипта гена *HvCOR14b* после 24 ч воздействия температуры –4 °С, хотя профили экспрессии этого гена могут отличаться в зависимости от генотипа. У исследованных генотипов характерно повышение уровня экспрессии гена *HvCBF14* через 2 ч после снижения температуры до –2 °С и после 2 ч воздействия температуры –4 °С, только у сорта Буслик мы можем наблюдать значительное увеличение уровня его экспрессии после 24 ч при –4 °С. Для неустойчивого к холоду генотипа характерны резкие колебания уровня экспрессии гена *HvCOR14b*. Показано влияние генотипа ячменя на уровень экспрессии генов *HvCBF14* и *HvCOR14b* при воздействии холодового стресса.

Следует отметить, что в Республике Беларусь исследования молекулярных основ зимостойкости ячменя ранее не проводились. При этом ранее в зарубежных исследованиях была показана роль генов *HvCBF14* и *HvCOR14b* в ответе данной культуры на воздействие холода. Так, A. Fricano с соавторами было выявлено наличие двух однонуклеотидных замен в гене *HvCBF14*, приводящих к отличиям по холодоустойчивости в европейских сортах ячменя различного генетического происхождения [14]. Также изучение E. J. Stockinger с соавторами уровня экспрессии различных *HvCBF* генов и в картирующей популяции ячменя 'Nure' × 'Tremois' выявило большее число транскриптов гена *CBF14* в геноме более холодоустойчивого сорта Nure [15]. Увеличение уровня экспрессии генов *HvCBF14* и *HvCOR14b* в каллусах и проростках сорта Nure при +4 °С было продемонстрировано в работах I. Vashegyi с соавторами [16]. Z. Jeknic с соавторами было показано увеличение уровня экспрессии гена *HvCOR14b* у сорта ячменя Golden Promise в ответ на холодовой стресс [17]. В проведенных M. Rapacz с соавторами исследованиях было установлено, что у растений, которые характеризовались более низкой морозостойкостью, накопление транскрипта и белка *HvCOR14b* наблюдалось после 7 и 14 дней холодовой акклиматизации (+2 °С), в то время как индукция экспрессии указанного гена у морозостойких растений наблюдалась в течение первого дня холодовой акклиматизации [18]. Эксперименты, проведенные в указанных исследованиях, проводились на различных генотипах ячменя и в различных условиях, поэтому сравнение представленных в них результатов между собой и с нашими данными в количественном отношении не представляется возможным. C. Campoli с соавторами при изучении экспрессии различных *CBF* генов у сортов ржи, пшеницы и ячменя при их акклиматизации к различным температурам показали, что экспрессия данных генов зависит от генотипа, времени подвергания растений холодовому стрессу, значения температуры и др. [19].

Заключение

В результате исследования было продемонстрировано влияние холода на значения уровня экспрессии генов *HvCBF14* и *HvCOR14b* у устойчивых к холоду по результатам полевых испытаний сорта Буслик, сортообразцов 990829, 990668, 989159, а также чувствительного к холоду сортообразца 9201077. Профили экспрессии гена *HvCOR14b* были схожи для устойчивых сортообразцов с некоторыми отличиями на определенных этапах моделируемого эксперимента в зависимости от генотипа. Так, основное накопление транскрипта гена *HvCOR14b* наблюдалось после 24 ч воздействия температурного режима –4 °С. Также для устойчивых сортообразцов мы можем наблюдать значительное увеличение экспрессии данного гена и при наступлении этапа температурного режима +2/–2 °С через 2 ч, за исключением сортообразца 990829. После 24 ч этапа +2/–2 °С наблюдалось снижение уровня экспрессии гена *HvCOR14b*, однако для сортообразца 989159 было показано увеличение его экспрессии на данном этапе. Уровень экспрессии данного гена у устойчивого сортообразца 990829, в отличие от других исследуемых образцов, был стабильно низким на протяжении практически всего мо-

делируемого эксперимента. Наибольшее увеличение уровня экспрессии гена *HvCOR14b* у данного сортообразца было показано при наступлении этапа –4 °С после 24 ч. Уровень экспрессии гена *HvCOR14b* был выше, чем гена *HvCBF14*. Установлено, что у устойчивых сортообразцов характерно повышение уровня экспрессии гена *HvCBF14* на двух этапах моделирования холодового стресса: через 2 ч после снижения температуры до –2 °С и после 2 ч воздействия температуры –4 °С. Только у сорта Буслик мы можем наблюдать значительное увеличение уровня экспрессии гена *HvCBF14* после 24 ч при –4 °С. Профиль экспрессии гена *HvCOR14b* чувствительного к холоду по результатам полевых испытаний сортообразца 9201077 отличался от устойчивых и показал значительные колебания уровня его экспрессии. Уровень экспрессии гена *HvCBF14* у данного сортообразца был также стабильно низким на протяжении всех этапов моделируемого эксперимента.

Таким образом, проведенное исследование показывает, что генотип ячменя значительно влияет на уровень экспрессии генов *HvCBF14* и *HvCOR14b* на протяжении всех этапов моделирования холодового стресса.

Список использованных источников

1. Barley: a translational model for adaptation to climate change / I. K. Dawson [et al.] // New Phytol. – 2015. – Vol. 206, № 3. – P. 913–931.

2. Cold conditioned: discovery of novel alleles for low-temperature tolerance in the Vavilov barley collection / A. H. Sallam [et al.] // Front Plant Sci. – 2021. – Vol. 12. – P. 1–16.

3. Genetics of barley tiller and leaf development / S. Shaaf [et al.] // Journal of Integrative Plant Biology. – 2019. – Vol. 61, № 3. – P. 226–256.

4. Genetic resources and precise gene editing for targeted improvement of barley abiotic stress tolerance / S. Karunarathne [et al.] // J Zhejiang Univ Sci B. – 2023. – Vol. 24, № 12. – P. 1 069–1 092.

5. 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. – 2024. – 36 с.

6. The *Triticeae CBF* gene cluster — to frost resistance and beyond / G. Caccialupi [et al.] // Cells. – 2023. – Vol. 12, № 2 606. – P. 1–28.

7. Low temperature tolerance is depressed in wild-type and abscisic acid-deficient mutant barley grown in Cd-contaminated soil / L. Liu [et al.] // Journal of Hazardous Materials. – 2022. – Vol. 430. – P. 128489.

8. ICE-CBF-COR signaling cascade and its regulation in plants responding to cold stress / D. Hwarari [et al.] // Int J Mol Sci. – 2022. – Vol. 23, № 1 549. – P. 2–20.

9. The barley *Frost resistance-H2* locus / M. Pasquariello [et al.] // Funct. Integr. Genom. – 2014. – Vol. 14, № 1. – P. 85–100.

10. Extensive allele mining discovers novel genetic diversity in the loci controlling frost tolerance in barley / D. Guerra [et al.] // Theor Appl Genet. – 2022. – Vol. 135. – P. 553–569.

11. The cold response of *CBF* genes in barley is regulated by distinct signaling mechanisms / Z. Marozsán-Tóth [et al.] // Journal of Plant Physiology. – 2015. – Vol. 181. – P. 42–49.

12. Экспрессия генов *TaDHN9-A*, *TaDHN13* и *TaDHN20* у сортов яровой пшеницы в ответ на засуху / А. Н. Заинчковская [и др.] // Молекулярная и прикладная генетика: сб. науч. тр. / Институт генетики и цитологии НАН Беларуси; редкол.: А. В. Кильчевский (гл. ред.) [и др.]. – 2023. – Т. 35. – С. 27–34.

13. Заинчковская, А. Н. Изучение уровня экспрессии генов *HvGT-8*, *HvGT-10* и *HvGT-42* у сортов озимого ячменя в моделируемых условиях холодового стресса / А. Н. Заинчковская, Е. А. Фомина, О. Ю. Урбанович // Молекулярная и прикладная генетика: сб. науч. тр. / Институт генетики и цитологии НАН Беларуси; редкол.: А. В. Кильчевский (гл. ред.) [и др.]. – 2024. – Т. 36. – С. 43–51.

14. Genetic variants of *HvCbf14* are statistically associated with frost tolerance in a European germplasm collection of *Hordeum vulgare* / A. Fricano [et al.] // Theor Appl Genet. – 2009. – Vol. 119. – P. 1 335–1 348.

15. Expression levels of barley *Cbf* genes at the *Frost resistance-H2* locus are dependent upon alleles at *Fr-H1* and *Fr-H2* / E. J. Stockinger [et al.] // Plant J. – 2007. – Vol. 51. – P. 308–321.

16. Cold response of dedifferentiated barley cells at the gene expression, hormone composition, and freezing tolerance levels: studies on

callus cultures / I. Vashegyi [et al.] // Mol Biotechnol. – 2013. – Vol. 54, № 2. – P. 337–349.

17. *Hv-CBF2A* overexpression in barley accelerates *COR* gene transcript accumulation and acquisition of freezing tolerance during cold acclimation / Z. Jeknic´ [et al.] // Plant Mol Biol. – 2014. – Vol. 84, № 1–2. – P. 67–82.

18. The effects of cold acclimation on photosynthetic apparatus and the expression of *COR14b* in four genotypes of barley (*Hordeum vulgare*) contrasting in their tolerance to freezing and high-light treatment in cold conditions / M. Rapacz [et al.] // Ann Bot. – 2008. – Vol. 101, № 5. – P. 689–699.

19. Comparative expression of *Cbf* genes in the *Triticeae* under different acclimation induction temperatures / C. Campoli [et al.] // Mol. Genet. Genom. – 2009. – Vol. 282, № 2. – P. 141–152.

A. N. Zainchkovskaya[1], A. A. Famina[1], A. V. Yaroshevich[2], A. A. Zubkovich[2], O. Yu. Urbanovich[1]

STUDY OF THE EFFECT OF COLD STRESS ON THE EXPRESSION LEVEL OF THE *HvCBF14* AND *HvCOR14b* GENES IN WINTER BARLEY VARIETY SAMPLES UNDER SIMULATED CONDITIONS

[1]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
[2]Republican Unitary Enterprise "Research and Practical Center of National Academy of Sciences of the Republic of Belarus for Arable Farming"
1 Timiriyazev St., 222160 Zhodino, the Republic of Belarus

A change in the expression level of the *HvCBF14* and *HvCOR14b* genes was studied by RT-PCR under cold stress conditions in the cold-resistant variety Buslik; variety samples 990829, 990668 and 989159; and the cold-sensitive variety sample 9201077. The greatest increase in the expression level of the *HvCBF14* gene by 69 times was revealed for the variety sample 990829 in 2 hours under conditions reaching –4 °C. The smallest increase in the expression level of this gene by 4 times was established for the variety sample 990668 in 2 hours under conditions reaching +4 °C. For the *HvCOR14b* gene, the greatest increase in its expression level was found for the 9201077 variety sample in 2 hours under conditions reaching –2 °C (by 1 236 times) and the smallest — for the Buslik variety in 2 hours under conditions reaching +4 °C (by 7 times). The effect of the barley genotype on the expression level of the *HvCBF14* and *HvCOR14b* genes under cold stress was shown. An increase in the expression of these genes was noted after the onset of –4 °C conditions in the cold-resistant samples. The expression level of the *HvCBF14* gene is generally lower than that of *HvCOR14b*.

Keywords: abiotic stress, transcription factors, winter barley, *HvCBF14* gene, *HvCOR14b* gene, cold stress.

Дата поступления в редакцию: 06 сентября 2024 г.

УДК 575.852'113:575.858:57.082.13

А. Н. Верчук[1,2], А. В. Кильчевский[1]

КРИМИНАЛИСТИЧЕСКАЯ ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДА *PINUS* С ПОМОЩЬЮ МАРКЕРА ДНК-ШТРИХКОДИРОВАНИЯ *rbcL*

[1]Государственное 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
[2]Государственное учреждение
«Научно-практический центр Государственного комитета судебных экспертиз Республики Беларусь»
Республика Беларусь, 220114, г. Минск, ул. Филимонова, 25

В данной статье представлены результаты дифференциации видов рода *Pinus* на основе анализа 1 014 нуклеотидных последовательностей хлоропластного маркера *rbcL*. Установлено, что данный маркер обладает высоким дифференцирующим потенциалом, позволяя уверенно различать такие произрастающие на территории Республики Беларусь виды, как *Pinus banksiana*, *Pinus mugo*, *Pinus nigra* и *Pinus sylvestris*. Проведен дополнительный анализ возможности дифференциации других представителей рода *Pinus* с помощью исследуемого маркера. Выявлены и охарактеризованы 158 высоковариабельных сайтов маркера *rbcL* по роду *Pinus*, для которых рассчитан вклад в видовую дифференциацию. Определены ключевые регионы маркера *rbcL* для дифференциации видов рода *Pinus*, на основе которых возможно создание родоспецифичных мини-ДНК-штрихкодов, подходящих для эффективного изучения малых количеств биоматериала или деградированных образцов.

Ключевые слова: *Pinus,* ДНК-штрихкодирование, объекты растительного происхождения, *rbcL*, видовая дифференциация, криминалистика.

Для цитирования: Верчук, А. Н. Криминалистическая дифференциация представителей рода *Pinus* с помощью маркера ДНК-штрихкодирования *rbcL* / А. Н. Верчук, А. В. Кильчевский // Молекулярная и прикладная генетика: сб. науч. тр. / Ин-т генетики и цитологии НАН Беларуси; редкол.: А. В. Кильчевский (гл. ред.) [и др.]. – Минск, 2024. – Т. 37. – С. 36–49.

Введение

Проблема идентификации и анализа следов, оставленных на месте преступления, является одной из ключевых задач криминалистики. Современные методы судебной экспертизы постоянно развиваются, и одно из перспективных направлений связано с использованием биологических следов, в частности, пыльцы растений. Изучение пыльцы позволяет не только установить связь между подозреваемыми и местом преступления, но и восстановить возможные маршруты их передвижения. Исследование пыльцы также применяется в случаях, когда имеет место перемещение вещественных доказательств (например, документов), перезахоронение трупов и сокрытие мест массовых захоронений; необходима реконструкция места преступления; требуется установить происхождение самодельных взрывных устройств и других трудно отслеживаемых объектов; необходимо установить единство происхождения объектов к одному источнику (принадлежность к одной партии лекарственного сырья или наркотических средств), в установлении мест происхождения товара и его качества (страна произрастания яблок или оценка качества меда). Сохраняя информацию о конкретных климатических и экологических условиях, пыльца может служить индикатором сезонных изменений и географического распространения, что позволяет криминалистам более точно определить временные рамки и контекст событий [1–3].

Пыльца сосны, как одной из наиболее рас-

пространенных и устойчивых к внешним воздействиям, представляет собой значимый объект для криминалистического исследования, поскольку присутствует практически во всех «пыльцевых отпечатках» в значительном количестве [1]. Анализ пыльцы сосны открывает новые горизонты в идентификации биогеографических и временных аспектов происшествий.

Представители рода сосна (*Pinus*) произрастают в различных частях света, включая Европу, Азию, Африку и Северную Америку, образуя один из самых крупных родов хвойных деревьев, который включает в себя более 120 видов сосен [4]. На территории Республики Беларусь род *Pinus* играет ведущую роль в образовании лесных массивов и занимает около 49% от лесного массива [5]. В Республике Беларусь род *Pinus* представлен шестью наиболее распространенными видами: *Pinus sylvestris*, *Pinus nigra*, *Pinus rigida*, *Pinus banksiana*, *Pinus strobus*, *Pinus cembra* [8]. Еще одни вид сосны (*Pinus mugo*) широко используется для озеленения городов и дачных участков.

Сосна является экономически значимым родом древесных растений, которое имеет множество применений — от промышленности до медицины. Широкое распространение представителей рода *Pinus* определяет их значимость в хозяйственной детальности, что обусловливает необходимость в точном определении вида, которое способно найти широкое применение для различных целей, включая криминалистику. Являясь ветроопыляемым растением, сосна образует большое количество пыльцы, которая также представляет научный интерес, в том числе для судебной экспертизы [3, 6, 7], для которой видовая идентификация исследуемого материала является одним из ключевых вопросов. Значимость сосны для судебно-экспертных исследований объясняется ее доминирующим распространением на территории Беларуси, что обусловливает частоту встречаемости представителей данного рода при проведении криминалистических исследований.

Цель работы — оценить эффективность дифференциации представителей рода *Pinus*, в том числе наиболее распространенных на территории Республики Беларусь, с использованием маркера ДНК-штрихкодирования *rbcL* и охарактеризовать степень значимости полиморфизмов в данном маркере для разработки мини-штрихкодов.

Материалы и методы

Оценка эффективности дифференциации этих видов была проведена с помощью биоинформатического и статистического анализа хлоропластного маркера ДНК-штрихкодирования *rbcL*, который представляет собой ген большой субъединицы рибулозобисфосфаткарбоксилазы и является наиболее подробно охарактеризованным геном хлоропластов растений [9]. Маркер *rbcL* рекомендован к использованию международной организацией CBOL (Consortium for the Barcode of Life, в данное время — International Barcode of Life) [10].

В исследовании использовали 25 образцов пыльцы, собранных с различных растений вида *P. sylvestris*, и 14 образцов *P. mugo*, которые произрастали на территории г. Минска и Минской области. Для выделения ДНК из пыльцы использовали набор ReliaPrep™ FFPE gDNA Miniprep System (Promega, США). Оценку качества выделенной ДНК проводили спектрофотометрически (концентрация ДНК, 260/280, 260/230).

Амплификацию ДНК-штрихкода проводили с помощью специфических праймеров *rbcLaF* 5'-ATGTCACCACAAACAGAGACTAAAGC-3' и *rbcLaR* 5'-GTAAAATCAAGTCCACCGCG-3' [11]. ПЦР проводили в объеме 8 мкл; смесь для амплификации включала готовый буфер для проведения ПЦР Quick-load Taq 2X Master Mix (ОДО «Праймтех», Беларусь), прямой и обратный праймеры в конечной концентрации 0,3 пмоль/мкл и деионизированную воду. Вносили 1 мкл матрицы ДНК в концентрации 2–5 нг/мкл. Амплификацию проводили в термоциклере C1000 Touch Thermal Cycler (BioRad, США). Результаты амплификации проверяли в 2%-ом агарозном геле.

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

генетическом анализаторе ABI 3500 DNA Analyzer (Applied Biosystems, США).

Дополнительно по исследуемому маркеру было проанализировано 975 нуклеотидных последовательностей, загруженных из базы данных Национального центра биотехнологической информации (англ. National Center for Biotechnology Information, NCBI). К видам, произрастающим на территории Республики Беларусь, принадлежало 194 образца, включая 39 собственных нуклеотидных последовательностей. Локальное выравнивание осуществлялось с помощью функции Clustal W программы BioEdit v.7.0.5.3. Статистический анализ был проведен программой MEGA X v.10.2.4, используя двухпараметрическую модель Кимуры (англ. Kimura 2-parameter, K2P) с построением политомической филограммы, используя дискретный метод наибольшего правдоподобия (Test Maximum likelihood method). Для оценки эффективности обнаруженных замен был применен метод машинного обучения — регрессионное дерево, реализованный в Python v.3.0.

В качестве референсного генома использовалась нуклеотидная последовательность полного генома хлоропласта сосны обыкновенной (>NC_035069.1 *P. sylvestris* chloroplast, reverse complete genome). С помощью данной последовательности были определены позиции замен.

Результаты и обсуждение

На первом этапе исследования из массива данных по маркеру *rbcL* были выбраны нуклеотидные последовательности для семи видов, распространенных на территории Республики Беларусь. Для этих видов были рассчитаны внутривидовые дистанции (табл. 1), которые колебались от 0,00022 ± 0,00015 для *P. strobus* до 0,00220 ± 0,00054 для *P. nigra*. Рассчитать внутривидовую дистанцию для *P. rigida* было невозможно, поскольку девять загруженных последовательностей относились к одному гаплотипу, т. е. нуклеотидные последовательности были идентичны. Среднее значение внутривидовой дистанции для семи видов оставило 0,001.

Значение межвидовой дистанции рассчитано для каждой пары видов изучаемого рода. В таблице 1 представлены значения межвидовой дистанции при сравнении распространенных на территории Беларуси видов. Как видно из таблицы 1, значения межвидовой

Таблица 1

Значения внутри- и межвидовой дистанции со стандартными ошибками

Виды (кол-во образцов)	***P. banksiana* (15)**	***P. cembra* (4)**	***P. mugo* (35)****	***P. nigra* (51)**	***P. rigida* (9)**	***P. strobus* (17)**	***P. sylvestris* (63)****
Внутривидовая дистанция	0,00086 ± 0,00030	0,00107 ± 0,00090	0,00111 ± 0,00054	0,00220 ± 0,00054	–	0,00022 ± 0,00015	0,00157 ± 0,00073
P. banksiana		0,00526*	0,00305*	0,00302*	0,00247*	0,00443*	0,00289*
P. cembra	0,02830		0,00487*	0,00488*	0,00496*	0,00186*	0,00491*
P. mugo	0,01164	0,02038		0,00176*	0,00262*	0,00395*	0,00202*
P. nigra	0,01119	0,02266	0,00518		0,00242*	0,00390*	0,00124*
P. rigida	0,00824	0,02554	0,00905	0,00861		0,00407*	0,00249*
P. strobus	0,02306	0,00516	0,01728	0,01758	0,02032		0,00390*
P. sylvestris	0,01161	0,02239	0,00556	0,00321	0,00904	0,01739	

Примечание. * — S.E. межвидовой дистанции; ** — количество исследуемых образцов, включая собственные нуклеотидные последовательности

дистанции для белорусских видов превышают внутривидовые, отношение которых составляет от 1,64 до 104,82. Часто упоминают правило «barcoding gap» (штрихкодовой промежуток, разрыв штрихкодирования), согласно которому для точного определения таксономической принадлежности межвидовые различия должны превышать внутривидовые более чем в 10 раз, но оно сформулировано приблизительно и обычно при ДНК-штрихкодировании растений выявляемые различия настолько низки, что правило «barcoding gap» не работает [9].

Среднее отношение дистанций для семи видов сосен равняется 23,35 ± 8,43, что значительно превышает правило «barcoding gap», это положительно характеризует выбранный для исследования маркер *rbcL*. В нашем исследовании мы не опираемся на данное правило, поскольку оно сильно отличается для разных групп живых организмов [9], тем более растений, и не может быть общепринятым, а только констатируем его. Стоит также отметить, что зафиксированный минимальный разрыв штрихкодирования 1,64, характерен для пары видов *P. sylvestris* × *P. nigra*, что указывает на низкое количество выявляемых замен между нуклеотидными последовательностями представителей данных видов, что, в свою очередь, приводит к более высокой вероятности неверного определения данных видов между собой.

Среднее значение межвидовой дистанции составило 0,0146, что в 14,6 раза больше среднего значения внутривидовой дистанции. Таким образом, маркер *rbcL* может проявить высокую эффективность в дифференциации семи изучаемых видов.

Для семи видов сосны было выявлено 27 уникальных гаплотипов по маркеру *rbcL* (*P. sylvestris* — 7, *P. mugo* — 4, P. *nigra* — 4, *P. rigida* — 1, *P. banksiana* — 6, *P. strobus* — 2, *P. cembra* — 3). Все выявленные гаплотипы были уникальны для изучаемых видов, из-за чего их можно считать видодифференцирующими, что приблизило эффективность данного маркера для исследуемого таксона к 100% по видам, произрастающим на территории Республики Беларусь. Построенное филогенетического дерево (рис. 1) наглядно отражает разделение нуклеотидных последовательностей, включая полученные экспериментальным путем, семи видов на отдельные клады. Также на рисунке 1 видно, что виды *P. sylvestris*, *P. mugo*, *P. nigra*, *P. rigida*, *P. banksiana*, *P. strobus*, *P. cembra* имеют достаточную генетическую дистанцию между собой для эффективной дифференциации объектов, происходящих от данных видов. Таким образом, можно сделать вывод, что исследуемый ДНК-штрихкод позволяет достоверно определять видовую принадлежность образцов сосны, семь видов которой произрастают на территории Республики Беларусь.

На круговой филограмме также можно отметить, что два образца *P. nigra* (MT238058.1, MT238055.1) значительно удалены от их основной клады, что также отражается на внутривидовой дистанции, которая почти в два раза выше (0,00220) следующей по величине дистанции рассчитанной для *P. mugo* (0,00111). С учетом значительной выборки *P. nigra*, можно предположить, что данные образцы могут происходить от иного вида сосны и были ошибочно зарегистрированы в базе нуклеотидных последовательностей NCBI.

Дифференциация семи наиболее распространенных на территории Республики Беларусь видов — это результат, который может использоваться как в научных исследованиях, так и в решении криминалистических задач. Однако, как круг объектов растительного происхождения, так и решаемые задачи при проведении судебных экспертиз могут сильно отличаться. Данный факт может привести к необходимости исследования тех видов *Pinus*, которые не характерны для флоры Беларуси. Например, если они были завезены и выращиваются в открытом грунте. Таких видов из рода *Pinus* в Беларуси зарегистрировано около 30 [8], но с учетом современных возможностей ботаников-любителей таких видов может быть значительно больше [12]. По этой причине актуально проведение дополнительного исследования нуклеотидных последовательностей маркера *rbcL*, принадлежащих к максимально широкому спектру представителей рода *Pinus* на предмет видовой дифференциации.

Для этой цели исследуемая выборка была расширена со 194 ДНК-штрихкодов от семи видов до 1 014 нуклеотидных последовательностей от 116 видов, т. е. было охвачено прак-

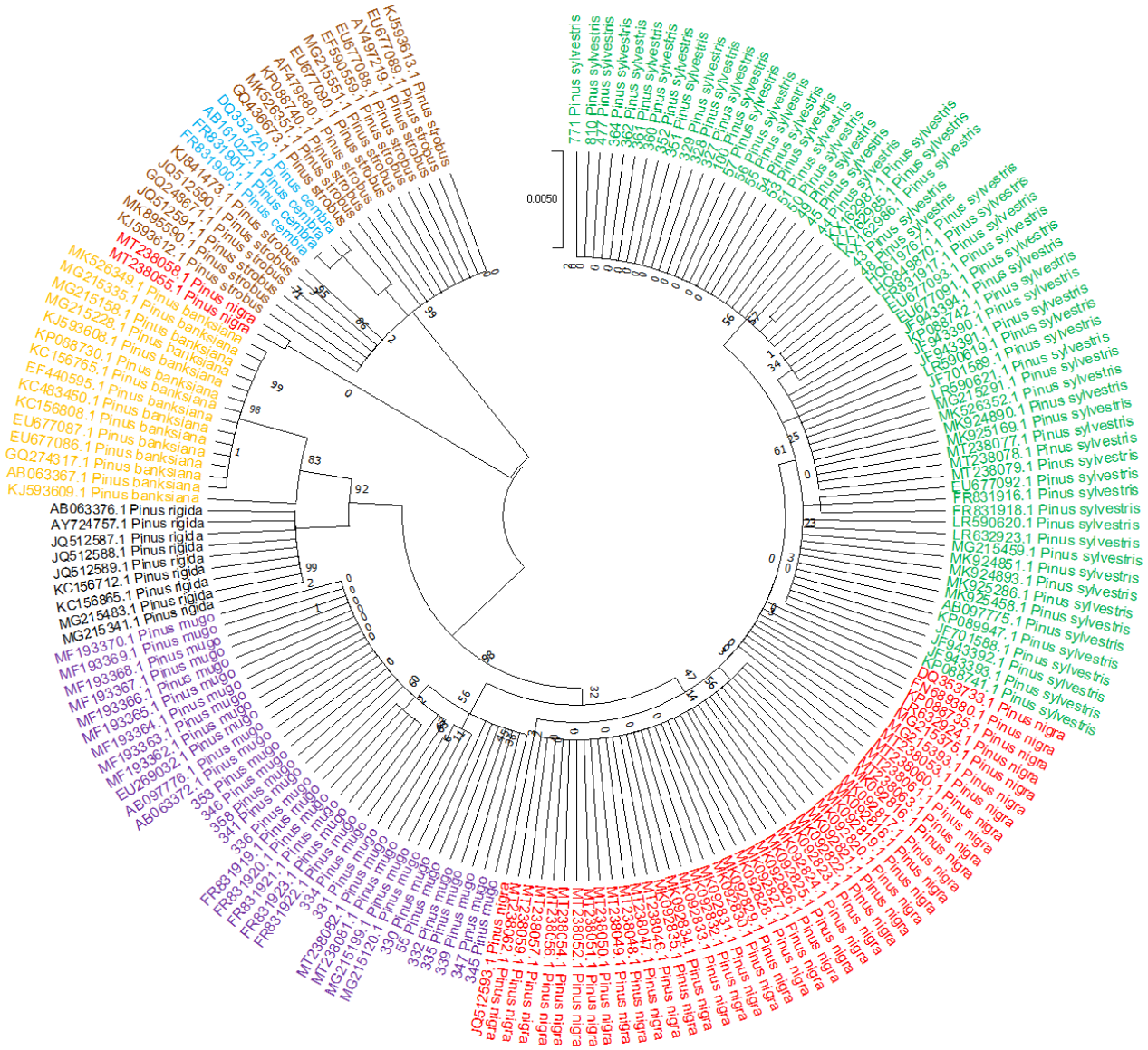

Рис. 1. Политомическая круговая филограмма, построенная с использованием дискретного метода наибольшего правдоподобия (Test Maximum likelihood method) на основе двухпараметрической модели Кимуры по маркеру *rbcL*

тически все видовое разнообразие рода *Pinus*. Подробная характеристика дополнительно исследуемой выборки (109 видов), внутривидовая дистанция и ее стандартная ошибка представлены в таблице 2.

Внутривидовая дистанция варьировалась в диапазоне от 0 до 0,00518 и для большинства исследуемых видов была относительно невелика, среднее значение равнялось 0,0007 для всех исследованных видов. Для трех видов (*P. catarinae*, *P. luchuensis*, *P. maestrensis*) было загружено по одной последовательности, по этой причине вычислить значение внутривидовой дистанции и ее стандартную ошибку для этих видов не представилось возможным. Для 45 видов было найдено по одному гаплотипу, несмотря на значительное количество исследуемых последовательностей в некоторых случаях (например, 23 нуклеотидные последовательности *P. ponderosa*) (табл. 2). В целом полученные результаты положительно характеризуют маркер *rbcL*, поскольку могут свидетельствовать о низком внутривидовом полиморфизме исследуемой области для видов рода *Pinus*, тем более что в случае с *P. ponderosa* последовательности были загружены в NCBI разными авторами из разных исследований, что снижает вероятность родства

Таблица 2

Внутривидовые показатели и характеристика выборки по маркеру *rbcL*

Вид (кол-во анализируемых последовательностей)	**Значение дистанции (d) с S.E.**	**Вид (кол-во анализируемых последовательностей)**	**Значение дистанции (d) с S.E.**	**Вид**
P. torreyana (5)	0,00518 ± 0,00131	*P. uncinata* (3)	0,00061 ± 0,00066	*P. gerardiana* (4)*
P. sabiniana (5)	0,00517 ± 0,00143	*P. discolor* (3)	0,00061 ± 0,00070	*P. glabra* (4)*
P. hwangshanensis (3)	0,00429 ± 0,00164	*P. maximartinezii* (3)	0,00061 ± 0,00062	*P. greggii* (13)*
P. merkusii (3)	0,00306 ± 0,00111	*P. sibirica* (3)	0,00061 ± 0,00060	*P. hartwegii* (13)*
P. massoniana (19)	0,00303 ± 0,00107	*P. elliottii* (10)	0,00055 ± 0,00030	*P. herrerae* (4)*
P. latteri (7)	0,00289 ± 0,00094	*P. taeda* (12)	0,00053 ± 0,00035	*P. jaliscana* (4)*
P. monophylla (3)	0,00245 ± 0,00130	*P. oocarpa* (11)	0,00050 ± 0,00028	*P. jeffreyi* (9)*
P. lambertiana (5)	0,00220 ± 0,00120	*P. yunnanensis* (4)	0,00048 ± 0,00042	*P. juarezensis* (2)*
P. tabuliformis (24)	0,00214 ± 0,00068	*P. occidentalis* (4)	0,00046 ± 0,00046	*P. krempfii* (6)*
P. ayacahuite (4)	0,00199 ± 0,00092	*P. pinea* (13)	0,00042 ± 0,00045	*P. kwangtungensis* (11)*
P. chiapensis (2)	0,00183 ± 0,00132	*P. devoniana* (9)	0,00041 ± 0,00029	*P. leiophylla* (16)*
P. washoensis (2)	0,00183 ± 0,00136	*P. brutia* (9)	0,00041 ± 0,00029	*P. monticola* (5)*
P. longaeva (3)	0,00183 ± 0,00111	*P. resinosa* (9)	0,00041 ± 0,00028	*P. morrisonocola* (8)*
P. edulis (6)	0,00171 ± 0,00072	*P. densata* (30)	0,00037 ± 0,00033	*P. muricata* (5)*
P. flexilis (5)	0,00165 ± 0,00096	*P. durangensis* (18)	0,00037 ± 0,00035	*P. palustris* (8)*
P. densiflora (22)	0,00139 ± 0,00077	*P. serotina* (5)	0,00037 ± 0,00042	*P. patula* (13)*
P. nelsonii (4)	0,00138 ± 0,00075	*P. tecunumanii* (5)	0,00037 ± 0,00037	*P. peuce* (3)*
P. cembroides (7)	0,00131 ± 0,00064	*P. wallichiana* (5)	0,00037 ± 0,00039	*P. ponderosa* (23)*
P. heldrechii (9)	0,00122 ± 0,00073	*P. halepensis* (30)	0,00034 ± 0,00036	*P. praetermissa* (4)*
P. johannis (30)	0,00122 ± 0,00086	*P. fenzeliana* (11)	0,00033 ± 0,00025	*P. pringlei* (4)*
P. pinaster (12)	0,00119 ± 0,00066	*P. clausa* (6)	0,00031 ± 0,00032	*P. pseudostrobus* (21)*
P. contorta (11)	0,00117 ± 0,00049	*P. lawsoni* (7)	0,00026 ± 0,00028	*P. pumila* (5)*
P. teocote (10)	0,00116 ± 0,00071	*P. parviflora* (8)	0,00023 ± 0,00027	*P. pungens* (3)*
P. taiwanensis (8)	0,00115 ± 0,00055	*P. montezumae* (10)	0,00018 ± 0,00018	*P. quadrifolia* (2)*
P. pinceana (5)	0,00110 ± 0,00063	*P. arizonica* (10)	0,00018 ± 0,00019	*P. roxburghii* (3)*
P. radiata (13)	0,00108 ± 0,00072	*P. albicaulis* (3)*		*P. rzedowskii* (3)*
P. koraiensis (7)	0,00105 ± 0,00052	*P. attenuata* (4)*		*P. squamata* (5)*
P. lumholtzii (6)	0,00092 ± 0,00052	*P. bhutanica* (15)*		*P. strobiformis* (5)*
P. aristata (4)	0,00092 ± 0,00064	*P. bungeana* (7)*		*P. thunbergii* (15)*

Окончание таблицы 2

Вид (кол-во анализируемых последовательностей)	Значение дистанции (d) с S.E.	Вид (кол-во анализируемых последовательностей)	Значение дистанции (d) с S.E.	Вид
P. kesiya (4)	0,00092 ± 0,00061	*P. canariensis* (3)*		*P. tropicalis* (2)*
P. remota (2)	0,00092 ± 0,00109	*P. caribaea* (8)*		*P. virginiana* (22)*
P. cooperi (2)	0,00092 ± 0,00086	*P. cubensis* (6)*		*P. yecorensis* (4)*
P. douglasiana (5)	0,00073 ± 0,00052	*P. culminicola* (2)*		*P. catarinae* (1)**
P. maximinoi (5)	0,00073 ± 0,00052	*P. dalatensis* (2)*		*P. luchuensis* (1)**
P. armandii (23)	0,00067 ± 0,00034	*P. echinata* (18)*		*P. maestrensis* (1)**
P. coulteri (6)	0,00061 ± 0,00048	*P. engelmannii* (7)*		
P. balfouriana (3)	0,00061 ± 0,00062	*P. georginae* (3)*		

Примечание. * — виды, для которых выявлен один гаплотип, а значение d (s.e) равно 0 ± 0; ** — виды, для которых была обнаружена одна нуклеотидная последовательность, значение d (s.e) установить невозможно

между различными образцами или использование одного и того же растения до минимума.

Однако виды, которые имеют значение внутривидовой дистанции более 0,002, имеют повышенный риск неверной дифференциации, поскольку вероятность пересечения с межвидовой дистанцией становится выше, а также растет вероятность возможных ошибок при определении вида сосны или регистрации ДНК-штрихкода, как в случае с *P. nigra* (MT238058.1, MT238055.1), который приведен выше (рис. 1).

Значение межвидовой дистанции рассчитано для каждой пары видов изучаемого рода, включая семь видов из первой части исследования. Однако из-за значительного количества пар (6 670), которые образованы 116 видами, проблематично отобразить рассчитанные значения межвидовой дистанции для каждой пары (файл «Дополнительные материалы.xls», лист «Таблица 1» [13]). Всего из 6 670 пар исследуемых видов 68 было со значением межвидовых дистанций равными нулю что указывает на наличие общих гаплотипов последовательностей у данных видов. Такое соотношение может свидетельствовать о том, что выбранный маркер для данных видов имеет низкую эффективность дифференциации, а виды в указанных парах могут неверно определяться между собой. Стоит отметить, что из семи наиболее интересующих видов только *P. rigida* имела межвидовую дистанцию в парах с видами *P. patula* и *P. pungens*, равную нулю. Также для вида *P. cembra* было установлено три (*P. dalatensis*, *P. kwangtungensis*, *P. morrisonocola* все со значением 0,00069), а для *P. strobus* четыре вида с низкой межвидовой дистанцией (*P. flexilis* d = 0,00153, *P. ayacahuite* d = 0,00171, *P. lambertiana* d = 0,00172, *P. sibirica* d = 0,00306). Для остальных пар данных видов межвидовая дистанция имела высокие показатели, что подтверждает эффективность исследуемого региона.

Всего с нулевой межвидовой дистанцией или более низкой, чем внутривидовая, было выявлено 187 пар из 6 670 и составило 2,8% от общего количества, что для штрихкодирования растений может рассматриваться как высокоточный результат. Также для всех исследуемых последовательностей была построена политоническая филограмма с использованием дискретного метода наибольшего правдоподобия (Test Maximum likelihood method) на основе двухпараметрической модели Кимуры (файл «Дополнительные материалы 2.png», [13]) которая отражает удаление образцов различных видов сосны, а также их распределение друг относительно друга.

При анализе дерева (файл «Дополнительные материалы 2.png», [13]), построенного по всем изучаемым последовательностям, были сделаны следующие выводы:

1) Исследуемые образцы *P. banksiana* сформировали устойчивую кладу с тремя ветвями, где две ветви были представлены по одному образцу. Один образец (KJ593609.1 *P. banksiana*) сформировал отдельную ветвь. Наиболее близко расположенным видом являлся *P. contorta*.

2) Три образца *P. cembra* образовывали свои ветви. Один образец *P. cembra* входил в ветвь дерева с образцами таких видов, как *P. morrisonicola*, *P. parviflora*, *P. koraiensis*, *P. lambertiana*, *P. armandii*, *P. kwangtungensis*, *P. fenzeliana*, *P. dalatensis*, *P. bhutanica*, *P. wallichiana*. Этот факт может значительно усложнить задачу дифференциации образцов, происходящих от данного вида.

3) Исследуемые образцы *P. mugo* имели общий корень с образцами *P. uncinata*, однако формировали отдельные ветви, которые были значительно удалены.

4) Исследуемые образцы *P. nigra* сформировали три относительно удаленных ветви, входящие в одну кладу с образцами таких видов, как *P. sylvestris*, *P. densiflora*, *P. tabuliformis*, что не оказывало влияния на успешную дифференциацию образцов. Образец *P. resinosa* (AB063384.1) входил в одну из трех ветвей, сформированных *P. nigra*, и был значительно удален от своей клады, которая была компактно расположена на значительном расстоянии, что дает возможность предполагать о неверной видовой идентификации данного образца и не учитывать его.

5) Исследуемые образцы *P. rigida* входили в общую ветвь с образцами видов *P. patula*, *P. pungens*, *P. taeda*, *P. tecunumanii*, что коррелирует с выводами, сделанными по межвидовым дистанциям, и дополнительно подтверждает возможные сложности дифференциации образцов *P. rigida*.

6) Исследуемые образцы *P. strobus* сформировали две значительно удаленные ветви, одна из которых формировала лист с представителями только *P. strobus*, а вторая включала в себя образцы видов *P. hartwegii*, *P. montezumae*, *P. pseudostrobus*.

7) Исследуемые образцы *P. sylvestris*, как уже обозначалось ранее, входили в одну кладу с образцами *P. nigra*, однако формировали свои обособленные и значительно удаленные ветви, что говорит о возможности безошибочной дифференциации образцов данного вида.

Обобщая, можно констатировать, что как по значениям с межвидовыми дистанциями, так и по построенному дереву *P. banksiana*, *P. mugo*, *P. nigra* и *P. sylvestris* возможно разделить с помощью маркера ДНК-штрихкодирвания *rbcL*. Выявленные проблемы дифференциации для трех видов (*P. cembra*, *P. rigida* и *P. strobus*) не являются критичными, поскольку те виды, которые могут помешать дифференциации, значительно удалены по ареалу обитания, что значительно снижает их одновременное присутствие в одном исследовании.

Длина последовательности маркера *rbcL*, которую использовали в анализе, составила ≈1 100 п. н. Фрагмент ДНК с такой длиной относительно сложно амплифицировать полностью, что может затруднить проведение секвенирования. Амплификация длинного фрагмента также может стать значительной проблемой при проведении судебной экспертизы, поскольку на исследование может поступить деградированный материал. Более того, такая длина фрагмента не удобна для проведения NGS (Next-Generation Sequencing), где рекомендуется исследовать фрагменты менее 300 п. н. По этой причине была составлена таблица замен исследуемой последовательности *rbcL* в зависимости от вида. Всего было выявлено 158 вариабельных сайтов (файл «Дополнительные материалы 3.xls», [13]), из которых 60 были характерны для видов (табл. 3) произрастающих в Республике Беларусь.

Для оценки степени значимости каждой замены исследовали дерево принятия решений (дерево классификации, регрессионное дерево). Это метод машинного обучения, который используется для предсказания значений зависимой переменной. Регрессионные деревья могут использоваться для решения задач регрессии, классификации и прогнозирования. Регрессионные деревья являются простым и эффективным методом машинного обучения, который может быть использован для решения различных задач, в том числе и для установления потенциала в дифференциации каждой замены отдельно.

Информация о потенциальном вкладе каждой замены анализировалась на предмет возможности создания высокоэффективных

Таблица 3

Положение и значение вариабельных сайтов для семи видов *Pinus*

	75358	**75418**	**75424**	**75436**	**75460**	**75469**	**75470**	**75472**	**75475**	**75484**	**75547**	**75553**	**75565**	**75568**	**75580**	**75586**	**75590**	**75604**	**75605**	**75606**	**75625**
P. banksiana	C/T	T	T	T	G	T	G	A	T	T	A	G	C	C	G	T/C	T/C	C	C/T	G	T
P. cembra	C	T	C	T	A	T	C	G	C	A	A	G	C	A	G	C	C	C	T	T	T
P. mugo	C/T	T	T	T	G	T	G	A	T	T	A	G	C	C	G	C	C	C	T	G	T
P. nigra	T	T	T/C	T/C	G/A	T/C	G	A/G	T/C	T	A/G	G/A	C/T	C	G	C	C	C/T	T/–	G/C	T/–
P. rigida	T	C	T	T	G	T	G	A	T	T	A	G	C	C	A	C	C	C	T	G	T
P. strobus	C	T	C	T	A	T	C	G	C	A	A	G	C	C/A	G	C	C	C	T	T	T
P. sylvestris	T	T	T	T	G	T	G	A	T	T	A	G	C	C	G	C	C	C	T	G	T
	75668	**75710**	**75719**	**75749**	**75763**	**75769**	**75790**	**75810**	**75817**	**75820**	**75826**	**75829**	**75865**	**75868**	**75871**	**75901**	**75904**	**75913**	**75922**	**75961**	**75970**
P. banksiana	A	G/A	G	C/A	A/T	C	T	T	A	A	T/A	T	T	G	T	G	A	G	A	G	A
P. cembra	G	G	G	C	A	C	T	G/T	G	A	A	T	T	G	T	G	A	G	G	G	G
P. mugo	A	A	G	C	A	C	T	T	A	A	A	T	T	G	T	G	A	G	A	G/A	A
P. nigra	A	A/G	G/A	A/C	A	C/T	T	T	A	A/G	A	T/C	T/C	G/A	T/C	G/A	A	G	A/G	G/A	A
P. rigida	A	G	G	C	A	C	C	T	A	A	A	T	T	G	T	G	A	G	A	G	A
P. strobus	G	G	G	C	A	C	T	T	A/G	A	A	T	T	G	T	G	A	G	G	G	G
P. sylvestris	A	A	G	A	A	C	T	T	A	A	A	T	T	G	T	G	A/G	G/A	A	G	A
	75988	**75998**	**76006**	**76030**	**76033**	**76063**	**76085**	**76107**	**76114**	**76129**	**76236**	**76239**	**76258**	**76298**	**76343**	**76345**	**76406**	**76441**			
P. banksiana	T	A	A	C	T	A	T	A	G	A	T	A	C	T	T	T	T	A			
P. cembra	C	T	A	C	T	A/G	C	A	A	G	C	T	A	C	C	G	C	G			
P. mugo	C	T	A	C	T	A/G	T	G	G	G	C	T/A	C	T	C	T	T	A			
P. nigra	C	T	A	C	T	A/G	T	A	G	G	C	T	C	T	C	T	T	A			
P. rigida	C	A	A	C	T	A	T	A	G	A	C	A	C	T	C	T	T	A			
P. strobus	C	T	A	C/G	Y/T	A	C	A	A	G	C	T	A	T	C	G	T	G			
P. sylvestris	C	T	G	C	T	A/G	T/C	A/G	G	G	C	T	C	T	C	T	T	A			

мини-штрихкодов или снижения длины амплифицируемого фрагмента для возможности проведения NGS. В своих исследованиях разные авторы используют отличающиеся праймеры к маркеру *rbcL*, что приводит к изучению части последовательности ДНК-штрихкода, знание об эффективности и положении замен также позволит оценить заранее выбранные маркеры на предмет успешности применения для дифференциации видов из рода *Pinus*. Также с помощью дерева решений возможно точно определить, образцы каких видов будут достоверно разделяться с помощью изучаемой нуклеотидной последовательности, а какие могут быть определены неверно, т. е. предсказать «точки риска».

На первом этапе после обучения регрессионного дерева проводился анализ по возможности установления вида изучаемого образца в зависимости от замен в нуклеотидных последовательностях по всему исследуемому массиву. Основной вклад в ошибочную дифференциацию образцов вносили пять видов сосны (*P. armandii*, *P. densata*, *P. echinate*, *P. patula*, *P. ponderosa*), которые в подавляющем большинстве случаев могут столкнуться с неверным установлением видового происхождения образца. Полученные результаты не критичны, поскольку данные виды встречаются далеко за пределами Республики Беларусь и имеют очень ограниченные ареалы [14]:

1) *P. armandii* (белая китайская) — ареал ограничен юго-востоком континентального Китая и на Тайване, а также с небольшими популяциями в северной Мьянме. Этот вид сосны растет преимущественно на высотах 1 000–3 300 м.

2) *P. densata* (сосна густая) — ареал находится в Китае, в высокогорных районах, на высотах 2 600–4 200 м над уровнем моря. Образует чистые леса в высокогорных районах, ниже 3 000 м может входить в смешанные с участием *P. armandii* и *P. yunnanensis*.

3) *P. echinate* (сосна короткохвойная) распространена на юго-востоке США.

4) *P. patula* (желтая мексиканская) распространена в теплых субтропических районах центральных и восточных штатов Мексики.

5) *P. ponderosa* (сосна орегонская) распространена в западных территориях США, Канады (Британская Колумбия) и Мексики.

Установленный вклад 158 позиций в дифференциацию неизвестных образцов приведен в таблице 4, замены расположены по убыванию их эффективности. Как видно из таблицы, 90,5% всего вклада в дифференциацию приходится именно на первые 66 замен (табл. 4).

При анализе эффективности для дифференциации видов сосны непосредственно SNP (Single Nucleotide Polymorphism, одиночная

Таблица 4

Вклад замены в дифференциацию и ее позиция относительно референсного хлоропластного генома

Позиция замены	Вклад замены	Позиция замены	Вклад замены	Позиция замены	Вклад замены	Позиция замены	Вклад замены
76006	0,04999	76406	0,00708	76135	0,00201	75372	0,00034
76075	0,04659	75598	0,00694	76438	0,00198	75719	0,00034
75358	0,04478	76138	0,00682	76324	0,00196	75841	0,00033
75961	0,03951	75817	0,00653	75810	0,00190	76427	0,00032
76085	0,03745	76292	0,00638	75831	0,00178	75731	0,00031
75710	0,03654	75988	0,00616	75835	0,00174	75851	0,00029
76445	0,03636	75451	0,00611	75421	0,00173	76426	0,00029
76333	0,03510	75586	0,00588	76429	0,00171	76455	0,00028
76107	0,02988	76203	0,00566	75942	0,00157	75885	0,00027
76083	0,02951	76073	0,00565	75610	0,00153	75769	0,00026

Окончание таблицы 4

Позиция замены	Вклад замены	Позиция замены	Вклад замены	Позиция замены	Вклад замены	Позиция замены	Вклад замены
75749	0,02943	76441	0,00547	75739	0,00146	75547	0,00026
76444	0,02567	75826	0,00539	76088	0,00146	75829	0,00026
75606	0,02051	75568	0,00499	75400	0,00146	75565	0,00023
76115	0,01946	75874	0,00485	76302	0,00132	75820	0,00023
75590	0,01924	75724	0,00482	76368	0,00124	76100	0,00023
76141	0,01853	76114	0,00478	75511	0,00121	76437	0,00023
76239	0,01839	75866	0,00470	75646	0,00121	75534	0,00021
75995	0,01815	75868	0,00466	76030	0,00120	76148	0,00021
76063	0,01739	76258	0,00461	75670	0,00120	75937	0,00021
75994	0,01710	76012	0,00461	75516	0,00120	76305	0,00020
75998	0,01552	75472	0,00429	76134	0,00118	76391	0,00019
75605	0,01135	75922	0,00377	75871	0,00112	76309	0,00019
75593	0,01085	75424	0,00373	76029	0,00108	76280	0,00018
75481	0,01020	75668	0,00365	76035	0,00089	75953	0,00018
75970	0,01012	76345	0,00362	75541	0,00085	76183	0,00018
76009	0,00981	75928	0,00360	75625	0,00083	75436	0,00017
76129	0,00911	75583	0,00352	75413	0,00082	75865	0,00017
75931	0,00896	75484	0,00349	76015	0,00076	75997	0,00017
76195	0,00888	75976	0,00349	75589	0,00076	75469	0,00016
75913	0,00868	75604	0,00341	75738	0,00069	75955	0,00015
75470	0,00854	75475	0,00341	75723	0,00066	76306	0,00015
75748	0,00823	75973	0,00339	75902	0,00064	75626	0,00015
76033	0,00805	75391	0,00321	75654	0,00060	76184	0,00015
75580	0,00785	75772	0,00312	75901	0,00058	75462	0,00013
75790	0,00767	75460	0,00280	75368	0,00053	76393	0,00010
75418	0,00766	76363	0,00276	75369	0,00050	75636	0,00000
76343	0,00743	75404	0,00275	75987	0,00046	75792	0,00000
75364	0,00739	75856	0,00273	75553	0,00041	76247	0,00000
76308	0,00723	75763	0,00214	75374	0,00041		
76236	0,00709	75588	0,00212	75986	0,00036		

нуклеотидная замена) (табл. 5) можно выделить несколько эффективных областей, которые имеют незначительную длину ампликона, удобную для метагеномного анализа или исследования сильно деградированного материала.

Таким образом, можно выделить пять наиболее значимых для определения вида сосны областей в маркере *rbcL* с размером ампликона от 127 до 207 п. н. Между данными областями также имеются значительные промежутки, на которые возможно подобрать эффективные родоспецифичные праймеры.

Таблица 5

Диапазон вариабельной области и вклад ее SNP в дифференциацию видов

Диапазон вариабельной области	Совокупный вклад SNP вариабельной области	Размер ампликона вариабельной области (п. н.)
75 358–75 484	0,11461	127
75 580–75 763	0,18621	184
75 772–75 931	0,07395	159
75 961–76 141	0,42087	181
76 239–76 445	0,17018	207

Заключение

Проведя анализ 1 014 нуклеотидных последовательностей, был установлен высокий дифференцирующий потенциал хлоропластного маркера *rbcL* для установления видовой принадлежности наиболее распространенных в Республике Беларусь представителей рода *Pinus*. При анализе последовательностей всех загруженных видов было установлено, что исследуемые образцы *P. banksiana*, *P. mugo*, *P. nigra* и *P. sylvestris* возможно уверенно разделить с помощью маркера ДНК-штрихкодирвания *rbcL*. Выявленные проблемы дифференциации для трех видов (*P. cembra*, *P. rigida* и *P. strobus*) не являются критичными, поскольку те виды, которые могут помешать дифференциации, значительно удалены по ареалу обитания, что значительно снижает их одновременное присутствие в одном исследовании.

Установлены наиболее значимые для дифференциации видов *Pinus* регионы в маркере *rbcL*, а также вклад каждой замены. Предложены пять родоспецифичных мини-ДНК-штрихкода, которые удобно использовать при исследовании малых количеств биоматериала или деградированных объектов, а также при проведении NGS.

Работа выполнена при финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований, грант № Б22М-068 от 04.05.2022.

Список использованных источников

1. Хох, А. Н. Современное состояние и перспективы развития судебно-палинологических экспертных исследований в Республике Беларусь / А. Н. Хох, Т. Б. Рылова // Криминалистика: вчера, сегодня, завтра. – 2020. – Т. 16, № 4. – С. 108–117.

2. Сезонова, Т. В. Современные методы судебной ботанической экспертизы в раскрытии и расследовании преступлений / Т. В. Сезонова // Научный вестник Орловского юридического института МВД России имени В. В. Лукьянова. – 2024. – Т. 98, № 1. – С. 210–219.

3. Верчук, А. Н. Направления современной палинологии и перспективы использования баркодирования ДНК для дифференциации растений по пыльце / А. Н. Верчук, С. В. Кубрак, А. В. Кильчевский // Молекулярная и прикладная генетика: сб. науч. тр. / Институт генетики и цитологии НАН Беларуси; редкол.: А. В. Кильчевский (гл. ред.) [и др.]. – Минск: Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, 2021. – Т. 31. – С. 134–146.

4. World Flora Online (2024): *Pinus* L. [Electronic resource]. – Mode of access: http://www.worldfloraonline.org/taxon/wfo-4000029794. – Date of access: 23.01.2024.

5. Министерство лесного хозяйства Республики Беларусь: Лесной фонд [Электронный ресурс]. – Режим доступа: https://mlh.by/our-main-activites/forestry/forests/. – Дата доступа: 23.01.2024.

6. Bell, K. L. Pollen DNA barcoding: current applications and future prospects / K. L. Bell [et al.] // Genome. – 2016. – Vol. 59, № 9. – P. 629– 640.

7. 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.

8. Информационно-поисковая система Центрального ботанического сада Национальной Академии наук Беларуси [Электронный ресурс]. – Режим доступа: http://hbc.bas-net.by/. – Дата доступа: 23.01.2024.

9. Шеховцов, С. В. ДНК-штрихкодирование: методы и подходы / С. В. Шеховцов, И. Н. Шеховцова, С. Е. Пельтек // Успехи современной биологии. – 2019. – Т. 139, № 3. – С. 211–220.

10. CBOL Plant Working Group A DNA Barcode for Land Plants / Proc Natl Acad Sci U S A. – 2009. – Vol. 106(31). – P. 12 794–12 797. – http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0905845106.

11. The Canadian Centre for DNA Barcoding http://ccdb.ca/site/wp-content/uploads/2016/09/CCDB_PrimerSets-Plants.pdf. CCDB [Electronic resource]: Canadian Centre for DNA Barcoding. – Mode of access: http://ccdb.ca/. – Date of access: 01.08.2024.

12. Ткаченко, К. Г. Ботанические коллекции — потенциальные источники возможных новых адвентивных и инвазивных видов / К. Г. Ткаченко // Вестник удмуртского университета. – 2013. – Вып. 2. – С. 39–42.

13. Дополнительные материалы. Zenodo [Электронный ресурс]. – Режим доступа: https://doi.org/10.5281/zenodo.13879798. – Дата доступа: 03.10.2024.

14. Плантариум. Растения и лишайники России и сопредельных стран: открытый онлайн атлас и определитель растений [Электронный ресурс]. – Режим доступа: https://www.plantarium.ru/. – Дата доступа: 28.08.2024.

A. N. Viarchuk[1,2], A. V. Kilchevsky[1]

FORENSIC DIFFERENTIATION OF THE GENUS *PINUS* REPRESENTATIVES USING THE DNA BARCODING MARKER *rbcL*

[1]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: a.n.verchuk@mail.ru
[2]State 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 article presents the results of the differentiation of species within the genus *Pinus* based on the analysis of 1,014 nucleotide sequences of the chloroplast marker *rbcL*. It was established that this marker has high differentiation potential making it possible to confidently distinguish between such species growing in the territory of the Republic of Belarus as *Pinus banksiana*, *Pinus mugo*, *Pinus nigra* and *Pinus sylvestris*. An additional analysis to explore the possibility of differentiating other representatives of the genus *Pinus* using the studied marker was carried out. A total of 158 highly variable sites of the *rbcL* marker for the genus *Pinus* were identified and characterized, and the contribution to species differentiation was calculated for them. The key regions of the *rbcL* marker for the differentiation of species within the genus *Pinus* were identified, which may serve as a basis for the creation of genus-specific mini-DNA barcodes suitable for the effective study of small quantities or degraded samples.

Keywords: *Pinus*, DNA barcoding, plant-based objects, *rbcL*, species differentiation, forensics.

Дата поступления в редакцию: 02 сентября 2024 г.

УДК 577.21:575.13:636.012

Т. В. Долматович[1], Н. С. Сазанович[2], В. Н. Кипень[1]

ИЗУЧЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ ЛОШАДЕЙ БЕЛОРУССКОЙ УПРЯЖНОЙ ПОРОДЫ

[1]Государственное научное учреждение
«Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси»
Республика Беларусь, 220072, г. Минск, ул. Академическая, 27
e-mail: t.dolmatovich@igc.by
[2]Республиканское дочернее унитарное предприятие по племенному делу «ЖодиноАгроПлемЭлита»
Республика Беларусь, 222168, Минская обл., аг. Барсуки, ул. Центральная, 1

В статье дана оценка генетического разнообразия лошадей белорусской упряжной породы по данным 16 микросателлитных локусов ДНК: AHT4, AHT5, ASB2, ASB17, ASB23, CA425, HMS1, HMS2, HMS3, HMS6, HMS7, HTG4, HTG6, HTG7, HTG10, VHL20. Рассчитаны показатели: среднее число аллелей на локус (Na), эффективное число аллелей (Ne), уровни ожидаемой (He) и наблюдаемой (Ho) гетерозиготности, значение информационного индекса Шеннона (I) и индекса фиксации (F_{IS}). Идентифицировано 45 редких аллелей (с частотой встречаемости менее 5%), что составляет 37,8% от общего количества выявленных аллелей. Число эффективных аллелей варьировало от 1,412 (HTG6) до 7,358 (VHL20). Среднее значение индекса Шенона составило 1,518 ± 0,094, что указывает на среднюю сложность структуры выборки. Показатель наблюдаемой гетерозиготности Ho был выше предполагаемого He и находился в интервале от 0,295 (HTG6) до 0,928 (VHL20). Среднее значение F_{IS} для выборки лошадей белорусской упряжной породы составило –0,019 ± 0,008. Полученные результаты свидетельствуют о достаточно высоком генетическом разнообразии лошадей белорусской упряжной породы.

Ключевые слова: белорусская упряжная порода лошадей, STR-локусы, генетические дистанции.

Для цитирования: Долматович, Т. В. Изучение генетического разнообразия лошадей белорусской упряжной породы / Т. В. Долматович, Н. С. Сазанович, В. Н. Кипень // Молекулярная и прикладная генетика: сб. науч. тр. / Ин-т генетики и цитологии НАН Беларуси; редкол.: А. В. Кильчевский (гл. ред.) [и др.]. – Минск, 2024. – Т. 37. – С. 50–58.

Введение

Белорусская упряжная — единственная национальная порода лошадей Республики Беларусь. Утверждена приказом Минсельхозпрода РБ № 132 от 25 мая 2000 г. и ей присвоено наименование «Белорусская упряжная». Зародилась порода в XIX в., и уже в 1850-х гг. на территории современной Беларуси существовало 22 конных завода и четыре заводские конюшни. Выведена методом сложного скрещивания местных кобыл с жеребцами норвежской, шведской, арденской, брабансонской и других пород [1]. Качества, которые ценились в белорусских упряжных лошадях и всячески закреплялись — выносливость, неприхотливость и приспособляемость практически к любым условиям, долгожительство, плодовитость. Благодаря этому белорусские упряжные лошади сохраняют работоспособность в весьма преклонном возрасте — 25–30 лет. В породе широко распространены нарядные масти — буланая и соловая, а также гнедая, рыжая, саврасая. Реже встречаются изабелловые представители.

В настоящее время белорусских упряжных лошадей разводят в следующих хозяйствах Республики: ОАО Агрокомбинат «Мир», ОАО «Полесская Нива», ОАО «Новоселки-Лучай», КСУП «Племзавод «Кореличи», ОАО «Кухчицы», РСУП «Совхоз «Лидский», государственное предприятие «ЖодиноАгроПлемЭлита», КУПСХП «Дриссенский».

На данный момент опубликовано большое количество работ по всему миру, в которых приведены данные о генетическом разнообразии и филогенетических исследованиях

лошадей как местных, аборигенных пород, так и заводских, включая тяжеловозные, рысистые, верховые [2, 3, 4, 5] на основе STR-маркеров (STR — короткие тандемные повторы). Использование в исследованиях международной стандартной панели STR-локусов позволяет численно сравнивать рассчитываемые параметры генетических оценок между популяциями.

Для белорусской упряжной породы данные по изучению генетического разнообразия и филогенетическому анализу в открытой печати не публиковались, и поэтому целью нашей работы было охарактеризовать генетическую структуру и разнообразие лошадей белорусской упряжной породы, разводимых на племенном конном заводе «ЖодиноАгроПлемЭлита» и КУПСХП «Дриссенский» на основе STR-локусов.

Материалы и методы

Материалом для исследований служили образцы волосяных луковиц из гривы 166 лошадей белорусской упряжной породы, полученные из племенного конного завода ГП «ЖодиноАгроПлемЭлита» — 94 образца и КУПСХП «Дриссенский» Верхнедвинского района — 72 образца.

ДНК выделяли из волосяных фолликулов лошадей с использованием набора «COrDIS ЭКСТРАКТ» (Gordiz, Россия) согласно инструкции производителя. Для амплификации использовали набор «COrDIS Horse» (Gordiz, Россия). Анализируемые STR-локусы набора «COrDIS Horse» составляют стандартную панель маркеров, рекомендованную Международным Обществом Генетики Животных (International Society of Animal Genetics — ISAG) [6]: AHT4, AHT5, ASB2, ASB17, ASB23, CA425, HMS1, HMS2, HMS3, HMS6, HMS7, HTG4, HTG6, HTG7, HTG10, LEX3, VHL20. Амплифицированные продукты детектировали методом капиллярного электрофореза на генетическом анализаторе AB3500 с использованием полимера POP-4. Обработку полученных данных проводили с использованием программного обеспечения GeneMapper v5.

В качестве контрастных популяций для исследования межпопуляционной дифференциации использовали 12 групп лошадей, представленных следующими выборками: Аппалуза (APP), Коннемара пони (CON), Фризская (FRI), Гронингенская (GRO), Ирландский коб (IRI), Польский коник (KON), Лузитано (LUS), Чистокровная верховая (THO), Тинкер (TIN), Уэльский пони (WEL1 и WEL2), Киргизская (KIR). В результате использованы генотипы 878 лошадей, представленных в открытом доступе [7].

Вычисление базовых статистических параметров популяционной генетики: среднее число аллелей на локус (Na), число эффективных аллелей (Ne), уровни ожидаемой (He) и наблюдаемой (Ho) гетерозиготности, значение информационного индекса Шеннона (I), коэффициенты F_{IS} и F_{ST}, расчет генетических дистанций по методу AMOVA (Analysis of molecular variance) проводили в программе GeneAlEx 6.5 [8]. В программе PAST v.4.03 выполнено построение дендрограммы на основе расчета генетических дистанций по методу AMOVA. Оценка ветвей филогенетического дерева проведена с использованием бутстрэп-анализа с 1 000-кратной генерацией выборок. Данные по локусу LEX3, локализованному в Х-хромосоме, при анализе базовых статистических параметров не учитывали.

Результаты и обсуждения

Полиморфизм микросателлитной ДНК у лошадей белорусской упряжной породы показал высокий уровень внутрипородной генетической вариабельности. Общее число аллелей в изученных нами 16 STR-локусах составило 119 с колебаниями по локусам от 14 для ASB17 до 4 для HTG7, при среднем значении аллельного разнообразия 7,438 ± 0,584, что свидетельствует о высоком генетическом разнообразии в породе. Наибольшим аллельным разнообразием характеризовались локусы: ASB17, AHT4, AHT5, HTG10, VHL20, а наименьшим — HTG6, HTG7 (табл. 1). Аналогичные данные получены на лошадях вятской, киргизской, мезенской породах [9, 10, 11].

Определены 45 редких аллелей (с частотой встречаемости менее 5%), что составляет 37,8% от общего количества выявленных аллелей (табл. 1) и свидетельствует о высокой генетической пластичности породы. В ряде локусов идентифицированы единичные аллели: AHT5–P, ASB2–C, ASB17–L, CA425–L, HTG6–L, HTG10–P, HTG10–S.

Генетическая структура лошадей белорус-

Таблица 1

Аллели, идентифицированные у лошадей белорусской упряжной породы

Локус	Локализация на хромосоме	Число аллелей на локус	Идентифицированные аллели
AHT4	24	9	H, I*, J**, K, L*, M, O, P, R*
AHT5	8	9	H*, I*, J, K, L, M, N, O, P*, C
ASB2	15	8	C*, I, K, M, N, O*, P*, Q
ASB17	2	14	F*, G*, H*, I*, J*, K, L, M, N, O*, P*, Q*, R, S*
ASB23	3	6	I, J, K, L, S, U
CA425	28	8	G*, H*, I, L*, M, N**, O, P*
HMS1	15	7	I*, J, K*, L*, M**, N*, Q*
HMS2	10	6	H**, I, J*, K, L, R*
HMS3	9	7	I*, M, N, O, P, Q, R
HMS6	4	6	K*, L**, M, N*, O, P**
HMS7	1	6	J, K, L**, M, N, O*
HTG4	9	6	K*, L, M**, O, P*, Q*
HTG6	15	5	G, I*, J*, L*, O**
HTG7	4	4	K, M, N, O**
HTG10	21	9	I*, K*, L*, M**, N, O**, P*, R, S*
VHL20	30	9	I, J*, L, M, N, O, P, Q, R

Примечание. * — отмечены редкие аллели с частотой встречаемости <5%; ** — отмечены аллели с частотой встречаемости >30%

ской упряжной породы характеризовалась высокой частотой встречаемости аллелей: AHT4–J, CA425–N, HMS1–M, HMS2–H, HMS6–L, HMS6–P, HMS7–L, HTG4–M, HTG6–O, HTG10–M, HTG10–O. Наибольшую распространенность получил аллель О в локусе HTG6 и встречался у 85% исследованных лошадей белорусской упряжной породы.

Число эффективных аллелей варьировало от 1,412 (HTG6) до 7,358 (VHL20), при среднем значении 4,116 ± 0,395 (табл. 2). В локусах AHT4, AHT5, ASB2, ASB17, CA425, HTG10 при наибольших значениях аллелей (Na) наблюдались относительно невысокие значения количества эффективных аллелей (Ne), что можно объяснить наличием в этих локусах редких аллелей. Чем больше расхождение, тем больше в выборке низкочастотных аллелей.

Индекс Шенона (I), который отражает сложность структуры выборки по данным количественной представленности объектов в популяции, имел значения от 0,613 (HTG6) до 2,072 (ASB17) (табл. 2). Среднее значение индекса Шенона составило 1,518 ± 0,094. В статье авторов [12] приведено, что для микросателлитных маркеров значения I считаются высокими, если они не менее 1,5. Это подтверждает достаточно высокое генетическое разнообразие в изученной выборке.

Показатель наблюдаемой гетерозиготности (Ho) находился в интервале от 0,295 (HTG6) до 0,928 (VHL20), при среднем значении 0,725 ± 0,039. Для локусов ASB2, ASB23, CA425, HMS1, HMS2, HMS3, HMS6, HMS7, HTG4, HTG6, VHL20 (табл. 2) показатель наблюдаемой гетерозиготности (Ho) был выше ожидаемой (He), что говорит о преобладании системы случайного скрещивания над инбридингом.

Показатель PIC (мера информационного полиморфизма) для всех локусов, кроме локуса HTG6, имел значение выше 0,5, что указывает на высокую информативную ценность при выявлении генетических различий между отдельными лошадьми. Наиболее информа-

Таблица 2

Генетическая характеристика лошадей белорусской упряжной породы по 16 аутосомным STR-локусам ДНК

	Na	Ne	I	Ho	He	PIC	F_{IS}
AHT4	9	4,869	1,765	0,789	0,795	0,797	0,007
AHT5	9	5,131	1,757	0,801	0,805	0,808	0,005
ASB2	8	4,222	1,614	0,813	0,763	0,765	–0,066
ASB17	14	5,894	2,072	0,825	0,830	0,833	0,006
ASB23	6	5,501	1,746	0,849	0,818	0,821	–0,038
CA425	8	3,722	1,565	0,771	0,731	0,734	–0,054
HMS1	7	2,062	1,091	0,518	0,515	0,516	–0,006
HMS2	6	2,803	1,282	0,645	0,643	0,645	–0,002
HMS3	7	5,755	1,816	0,867	0,826	0,829	–0,050
HMS6	6	3,312	1,360	0,729	0,698	0,700	–0,044
HMS7	6	3,826	1,529	0,753	0,739	0,741	–0,019
HTG4	6	2,322	1,134	0,572	0,569	0,571	–0,005
HTG6	5	1,412	0,613	0,295	0,292	0,292	–0,012
HTG7	4	3,820	1,363	0,729	0,738	0,740	0,013
HTG10	9	3,845	1,520	0,717	0,740	0,742	0,031
VHL20	9	7,358	2,060	0,928	0,864	0,867	–0,074
Среднее значение	7,438	4,116	1,518	0,725	0,710	0,713	–0,019
Стандартное отклонение	0,584	0,395	0,094	0,039	0,037	0,037	0,008

Примечание. Na — количество выявленных аллелей на локус, Ne — количество эффективных аллелей, I — индекс разнообразия Шенона, Ho — наблюдаемая гетерозиготность, He — ожидаемая гетерозиготность, PIC — величина информационного полиморфизма, F_{IS} — индивидуальный индекс фиксации

тивными (по значениям PIC) оказались следующие локусы: AHT4, AHT5, ASB2, ASB17, ASB23, CA425, HMS3, HTG7, HTG10, VHL20. Наименьший информационный вклад внесли — HMS1, HTG4, HTG6.

Значения индекса фиксации F_{IS} варьировали от –0,074 для локуса VHL20 до 0,031 для локуса HTG10 (табл. 2). Положительные значения F_{IS} показаны для локусов AHT4, AHT5, ASB17, HTG7, HTG10, что позволяет сделать заключение о наличии незначительного сдвига в сторону процессов инбридинга по отдельным локусам. Отрицательные значения F_{IS} указывают на избыток гетерозигот в выборке. Среднее значение F_{IS} для выборки лошадей белорусской упряжной породы составило –0,019 ± 0,008.

Нами проведен сравнительный статистический анализ данных между отобранными 12 контрастными популяциями лошадей различных пород, представленных в открытом доступе [7], и выборкой белорусской упряжной породы по 16 STR-локусам. Из таблицы 3 видно, что наибольшее среднее число аллелей выявлено у киргизской породы лошадей (8,813 ± 0,697) и уэльского пони (8,063 ± 0,536). Наименьшее среднее число аллелей среди изученных пород — у фриз-

ской и чистокровной верховой. У белорусской упряжной среднее значение составило 7,438 ± 0,584. Интересно, что наибольшую распространенность (50% и выше) получил аллель AHT4–J (94%) у фризской породы лошадей. Аллель ASB2–N (51%) — у ирландского коба, ASB17–M (52%) — у гронингенской породы. Аллель CA425–M (88%) — у фризской породы, а CA425–N — у польского коника (51%), тинкера (55%), уэльского пони (53%), чистокровной верховой (51%). HMS1–N с наибольшей частотой встречался у следующих пород: коннемара пони (74%), фризская (62%), ирландский коб (62%), лузитано (59%), тинкер (57%) и белорусская упряжная (67%). Аллель HMS2–H представлен у фризской (55%) и белорусской упряжной (54%), HMS2–L — у чистокровной верховой (70%), HMS2–K — у уэльского пони (58%). У фризской породы лошадей аллели HMS3–P и HMS3–R составили 49 и 51% соответственно. У ирландского коба преобладал аллель HMS3–P и представлен у 63% лошадей, у тинкера — у 54%, а у чистокровной верховой аллель HMS3–I представлен у 51% особей. Что касается локуса HTG6, то у большинства пород преобладал аллель HTG6–O (50% и выше), включая и белорусскую упряжную породу (84%).

Для белорусской упряжной породы характерно то, что аллельный состав по большинству аллелей не превышал уровня 50%, кроме аллелей HMS1–N, HMS2–H, HTG4–M и HTG6–O.

Высокий показатель среднего значения числа эффективных аллелей (Ne) наблюдался у следующих пород лошадей: белорусская упряжная (4,116 ± 0,395), коннемара пони (4,202 ± 0,281), уэльский пони выборки 1 (4,170 ± 0,310) и 2 (4,228 ± 0,293). Наиболее высоким показателем обладали лошади киргизской породы (8,813 ± 0,697) [13]. Из таблицы 3 видно, что для лошадей белорусской упряжной породы и проанализированных нами контрастных пород величина Ne (среднее число эффективных аллелей) ниже величины Na (среднее число выявленных аллелей) и зависит от доминирующих аллелей, а также присутствия низкочастотных аллелей.

Рассчитанный средний показатель наблюдаемой гетерозиготности (Ho) превышал ожидаемый (He) у следующих пород лошадей: белорусская упряжная, фризская, гронингенская, лузитано, тинкер, чистокровная верховая. На

Таблица 3

Генетическая характеристика 13 популяций лошадей различных пород по 16 аутосомным STR-локусам ДНК

Популяция	Среднее значение/ стандартное отклонение	Na	Ne	I	Ho	He	F_{IS}
Белорусская упряжная	Среднее значение	7,438	4,116	1,518	0,725	0,710	–0,019
	Стандартное отклонение	0,584	0,395	0,094	0,039	0,037	0,008
Коннемара пони	Среднее значение	6,813	4,202	1,550	0,726	0,736	0,024
	Стандартное отклонение	0,430	0,281	0,078	0,039	0,027	0,025
Фризская	Среднее значение	4,125	2,178	0,849	0,459	0,451	–0,032
	Стандартное отклонение	0,315	0,262	0,105	0,052	0,054	0,015
Гронингенская	Среднее значение	5,938	3,858	1,471	0,752	0,727	–0,032
	Стандартное отклонение	0,442	0,206	0,062	0,029	0,017	0,028
Ирландский коб	Среднее значение	7,563	3,745	1,492	0,707	0,711	0,003
	Стандартное отклонение	0,465	0,275	0,064	0,020	0,021	0,010
Польский коник	Среднее значение	6,563	3,611	1,432	0,685	0,694	0,014
	Стандартное отклонение	0,447	0,234	0,081	0,034	0,033	0,014
Лузитано	Среднее значение	6,438	3,965	1,471	0,725	0,706	–0,019
	Стандартное отклонение	0,456	0,334	0,095	0,041	0,037	0,030

Окончание таблицы 3

Популяция	Среднее значение/ стандартное отклонение	Na	Ne	I	Ho	He	F_{IS}
Тинкер	Среднее значение	6,375	3,655	1,466	0,714	0,713	0,001
	Стандартное отклонение	0,364	0,215	0,051	0,023	0,016	0,017
Уэльский пони 1	Среднее значение	7,563	4,170	1,585	0,717	0,741	0,034
	Стандартное отклонение	0,508	0,310	0,064	0,024	0,018	0,016
Уэльский пони 2	Среднее значение	8,063	4,228	1,626	0,711	0,749	0,052
	Стандартное отклонение	0,536	0,293	0,060	0,023	0,015	0,015
Киргизская	Среднее значение	8,813	5,005	1,752	0,775	0,780	0,005
	Стандартное отклонение	0,697	0,386	0,072	0,020	0,018	0,017
Аппалуза	Среднее значение	7,625	4,444	1,639	0,741	0,758	0,024
	Стандартное отклонение	0,482	0,278	0,063	0,026	0,019	0,017
Чистокровная верховая	Среднее значение	5,000	3,515	1,323	0,688	0,685	–0,008
	Стандартное отклонение	0,329	0,292	0,073	0,024	0,026	0,015

Примечание. Na — среднее число выявленных аллелей на локус, Ne — среднее число эффективных аллелей, I — индекс разнообразия Шенона, Ho — наблюдаемая гетерозиготность, He — ожидаемая гетерозиготность, F_{IS} — индивидуальный индекс фиксации

показатель He влияют высокочастотные (доминирующие) аллели, которые занижают аллельное разнообразие популяции.

Средние значения F_{IS} между проанализированными породами варьировали от –0,032 для лошадей фризской и гронингенской породы до 0,052 для уэльского пони (табл. 3). Значения, близкие к нулю, ожидаются при случайном скрещивании, а существенные положительные значения указывают на инбридинг или необнаруженные нуль-аллели.

По данным парных генетических дистанций в программе GenAIEx v.6.5 по методу AMOVA нами построена дендрограмма с использованием алгоритма Neighbour joining (рис. 1).

Анализ генетических дистанций показал, что 13 выборок лошадей формируют три основных кластера. Все породы лошадей, взятые в анализ, имеют разные направления селекции и относятся к верховым, упряжным, верхово-упряжным, средне-тяжеловозным, пони, степным, местным, которые генетически удалены друг от друга. Исследуемые выборки лошадей разводятся в различных географичес-

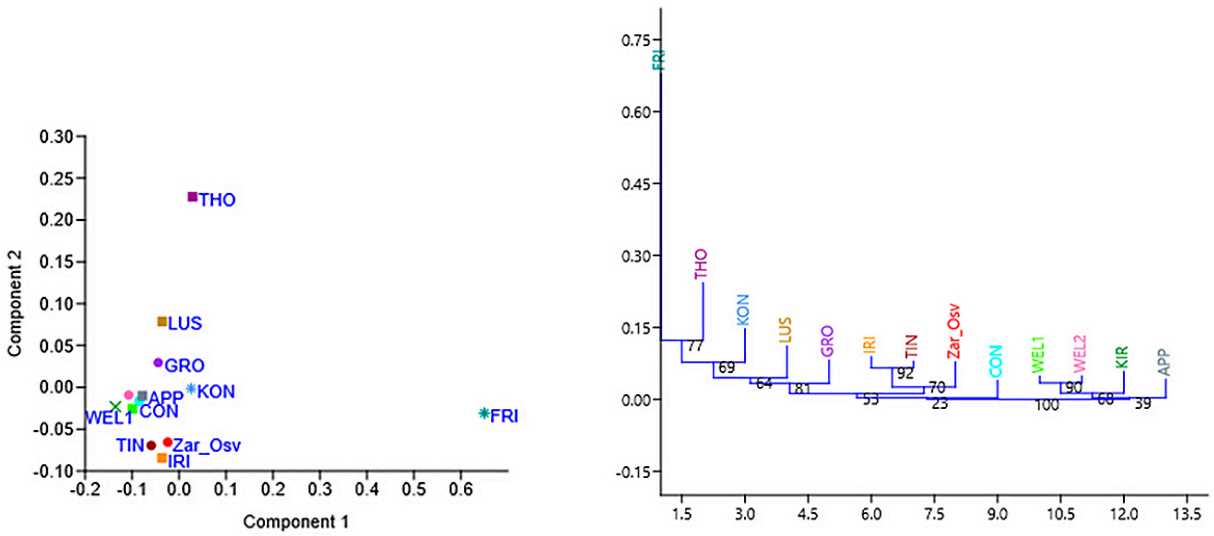

Рис. 1. Генетические дистанции между 13 выборками лошадей. Цифрами указаны значения бутстрэп-поддержки

ких частях мира и используются в качестве рабочих и верховых лошадей, а также для получения молока и мяса и, соответственно, в представленной дендрограмме, группируются по кладам. Белорусская упряжная порода, разводимая в ГП «ЖодиноАгроПлемЭлита» и КУПСХП «Дриссенский», формирует отдельную ветвь и генетически близка к упряжным породам гронингенская и ирланский коб или тинкер. Исторически белорусская упряжная порода формировалась путем прилития кровей русского и литовского тяжеловозов, торийских лошадей, латвийской упряжной, жемайчу, норвежской породы [1]. Поэтому нами планируется провести филогенетический анализ данных по STR-локусам белорусской упряжной породы и таких пород лошадей, как советская, русская, литовская, владимирский тяжеловоз, тори, жемайтская, латвийская, вятская и др.

Заключение

В результате проведенных исследований дана характеристика аллелофонда лошадей белорусской упряжной породы по микросателлитной ДНК. Показано, что лошади белорусской упряжной породы обладают высоким уровнем генетической вариабельности и значительным генетическим потенциалом.

Общее число выявленных аллелей составило 119 с колебаниями по локусам от 14 для ASB17 до 4 для HTG7. Определены 45 редких аллелей (с частотой встречаемости менее 5%), что составляет 37,8% от общего количества выявленных аллелей. В ряде локусов идентифицированы единичные аллели: AHT5–P, ASB2–C, ASB17–L, CA425–L, HTG6–L, HTG10–P, HTG10–S. Генетическая структура лошадей белорусской упряжной породы характеризовалась высокой частотой встречаемости аллелей: AHT4–J, CA425–N, HMS1–M, HMS2–H, HMS6–L, HMS6–P, HMS7–L, HTG4–M, HTG6–O, HTG10–M, HTG10–O. Аллель О в локусе HTG6 встречался у 85% исследованных лошадей. Показатель наблюдаемой гетерозиготности (Но) был выше предполагаемого (Не) и находился в интервале от 0,295 (HTG6) до 0,928 (VHL20).

Значения индекса фиксации F_{IS} варьировали от –0,074 для локуса VHL20 до 0,031 для локуса HTG10. Положительные значения F_{IS} показаны для локусов AHT4, AHT5, ASB17, HTG7, HTG10, что позволяет сделать заключение о наличии незначительного сдвига в сторону процессов инбридинга по отдельным локусам. При том, что среднее значение F_{IS} для выборки лошадей белорусской упряжной породы составило –0,019 ± 0,008, наблюдающееся в Республике сокращение численности поголовья маточного состава лошадей белорусской упряжной породы в будущем приведет к проявлению инбридинга не только по отдельным локусам, но и в породе в целом.

Список использованных источников

1. Гладенко, В. К. Книга о лошади. – М.: РИА «ИМ-Информ», 1999. – 368 с.

2. Genetic Diversity of Kazakhstani Equus caballus (Linnaeus, 1758) Horse Breeds Inferred from Microsatellite Markers / Z. Orazymbetova [et al.]. – Vet. Sci. – 2023. – № 10. – P. 598. DOI: 10.3390/vetsci10100598.

3. Оценка генетического разнообразия и структуры автохтонных пород лошадей России и Монголии с использованием ядерных и митохондриальных ДНК-маркеров / В. Н. Воронкова [и др.]. – Генетика. – 2022. – Т. 58, № 8. – С. 902–919. DOI:10.31857/S0016675822080100.

4. Блохина, Н. В. Использование ДНК-маркеров для идентификации сохранения и развития генетических ресурсов коневодства Российской Федерации: дис. ... докт. с/х. наук: 06.02.07 / Н. В. Блохина. – Д., 2022. – 271 с.

5. Esdaile, E. Analysis of Genetic Diversity in the American Standardbred Horse Utilizing Short Tandem Repeats and Single Nucleotide Polymorphisms / E. Esdaile, F. Avila, R. R. Bellone. – J Hered. – 2022. – Vol. 113, № 3. – P. 238–247. DOI:10.1093/jhered/esab070.

6. NIST [Электронный ресурс]. – 2024. – Режим доступа: https://strbase-archive.nist.gov/horseSTRs.htm. – Дата доступа: 01.09.2024.

7. Van de Goor, L. H. Population studies of 17 equine STR for forensic and phylogenetic analysis / L. H. van de Goor, W. A. van Haeringen, J. A. Lenstra. – Anim Genet. – 2011. – Vol. 42, № 6. – P. 627–633. DOI:10.1111/j.1365-2052.2011.02194.x.

8. Peakall, R. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update / R. Peakall, P. E. Smouse.

– P. 2 537–2 539.

9. Оценка генеалогической структуры вятской породы лошадей (*Equus ferus caballus*) с использованием анализа ДНК / Л. А. Храброва [и др.]. – Генетика. – 2022. – Т. 58, № 4. – С. 457–462. DOI:10.31857/S0016675822040063.

10. Генетический портрет кыргызской лошади / Ж. Т. Исакова [и др.]. – Коневодство и конный спорт. – 2018. – № 1. – С. 21–22. DOI:10.25727/HS.2018.1.19768.

11. Вдовина, Н. В. Мониторинг генетической структуры мезенской породы лошадей по микросателлитам ДНК / Н. В. Вдовина, И. Б. Юрьева. – Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2021. – Т. 25, № 2. – С. 202–207. DOI:10.18699/VJ21.024.

12. Галинская, Т. В. Предубеждения о микросателлитных исследованиях и как им противостоять / Т. В. Галинская, Д. М. Щепетов, С. Н. Лысенков. – Генетика. – 2019. – Т. 55, № 6. – С. 617–632. DOI:10.1134/S0016675819060043.

13. Филогенетический анализ для кыргызской породы лошадей по 17 микросателлитным маркерам / Ж. Т. Исакова [и др.]. – Генетика. – 2019. – Т. 55, № 1. – С. 94–99. DOI:10.1134/S0016675819010077.

T. V. Dolmatovich[1], N. S. Sazanovich[2], V. N. Kipen[1]

GENETIC DIVERSITY STUDY OF BELARUSIAN HARNESS HORSES

[1]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: t.dolmatovich@igc.by
[2]Republican Affiliated Unitary Enterprise for Livestock Breeding "ZhodinoAgroPlemEhlita"
1 Tsentralnaya St., 222168 Agro-town Barsuki, Minsk Region, the Republic of Belarus

The Article provides an assessment of the genetic diversity of Belarusian harness horses based on the data on 16 DNA microsatellite loci: AHT4, AHT5, ASB2, ASB17, ASB23, CA425, HMS1, HMS2, HMS3, HMS6, HMS7, HTG4, HTG6, HTG7, HTG10 and VHL20. The following parameters were calculated: the average number of alleles per locus (Na), the effective number of alleles (Ne), the expected (He) and observed (Ho) heterozygosity levels, the Shannon information index (I), and the fixation index (F_{IS}). A total of 45 rare alleles (with a frequency of less than 5%) were identified, which constitutes 37.8% of the total number of the alleles found. The number of effective alleles ranged from 1.412 (HTG6) to 7.358 (VHL20). The average value of the Shannon index was 1.518 ± 0.094, indicating moderate structural complexity in the sample. The observed heterozygosity (Ho) exceeded the expected heterozygosity (He), ranging from 0.295 (HTG6) to 0.928 (VHL20). The average F_{IS} value for the Belarusian draft horse sample was –0.019 ± 0.008. The results indicate a fairly high level of genetic diversity in the Belarusian harness horse population.

Keywords: Belarusian harness horse, STR-loci, genetic distances.

Дата поступления в редакцию: 16 сентября 2024 г.

УДК 575.11:616.24-002-07:616.12.07

Е. П. Михаленко[1], Д. В. Лапицкий[2], Ю. В. Полюхович[1], Н. П. Митьковская[2], А. В. Кильчевский[1]

АНАЛИЗ ПОЛИМОРФНЫХ ВАРИАНТОВ ГЕНОВ *VEGFA*, *KDR* И ИХ ГАПЛОТИПОВ У ПАЦИЕНТОВ С ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ СЕРДЦА И ХРОНИЧЕСКОЙ ОБСТРУКТИВНОЙ БОЛЕЗНЬЮ ЛЕГКИХ

[1]Государственное научное учреждение
«Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси»
Республика Беларусь, 220072, г. Минск, ул. Академическая, 27
e-mail: e.michalenko@igc.by
[2]Учреждение образования
«Белорусский государственный медицинский университет»
Республика Беларусь, 220016, г. Минск, пр. Дзержинского, 83

Хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ) и сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ) входят в пятерку основных причин смертности в мире. В последние годы появляется все больше исследований, изучающих генетическую предрасположенность к развитию и течению как ССЗ, так и ХОБЛ. Цель исследования — оценить влияние полиморфных вариантов rs699947, rs3025039, rs2010963 гена *VEGFA* и rs1870377 гена *KDR* на риск развития хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ) и ишемической болезни сердца (ИБС) у мужчин.

Показано влияние гетерозиготного генотипа CA rs699947 гена *VEGFA* на риск предрасположенности к ХОБЛ: доля носителей генотипа CA в группе пациентов с ХОБЛ статистически значимо больше по сравнению с долгожителями ($p = 0,02$) и пациентами с ИБС ($p = 0,01$). Установлено, что носительство генотипов CC и GC rs2010963 гена *VEGFA* достоверно чаще наблюдалось в группе пациентов с ИБС по сравнению с ДЖ (ОШ 2,2; 95% ДИ: 1,3–3,9; $p = 0,01$). Выявлено статистически значимое неравновесное сцепление между локусами rs699947 и rs2010963 во всех изучаемых группах (r 0,532–0,548; $p < 0,001$). Показано влияние комбинаций аллелей C–T (rs2010963–rs1870377) и C–C–T (rs699947–rs2010963–rs1870377) в формировании предрасположенности к развитию ИБС.

Ключевые слова: полиморфизм генов, фактор роста эндотелия сосудов, хроническая обструктивная болезнь легких, ишемическая болезнь сердца, долгожители.

Для цитирования: Анализ полиморфных вариантов генов *VEGFA*, *RDR* и их гаплотипов у пациентов с ишемической болезнью сердца и хронической обструктивной болезнью легких / Е. П. Михаленко, Д. В. Лапицкий, Ю. В. Полюхович [и др.] // Молекулярная и прикладная генетика: сб. науч. тр. / Ин-т генетики и цитологии НАН Беларуси; редкол.: А. В. Кильчевский (гл. ред.) [и др.]. – Минск, 2024. – Т. 37. – С. 59–70.

Введение

Сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ) являются ведущей причиной смертности в мире. По данным Всемирной Организации Здравоохранения, ежегодно от ССЗ умирает более 17,5 млн человек [1]. Хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ) занимает третье место в структуре смертности после ССЗ и инсульта [2]. Затраты на ХОБЛ, от которой страдают более 400 млн человек в мире, колоссальны: Всемирный экономический форум подсчитал, что к 2030 г. глобальные затраты на ХОБЛ достигнут 50 трлн долларов США в год [2, 3]. ХОБЛ часто сочетается с другими заболеваниями, которые могут существенно ухудшить прогноз пациента, кроме того, коморбитность данной патологии затрудняет диагностику [4]. Ишемическая болезнь сердца (ИБС) и хроническая сердечная недостаточность (ХСН) являются основной патологией, которая сопутствует ХОБЛ [5, 6].

В последние годы появляется все больше исследований, изучающих генетическую предрасположенность к развитию и течению как

ССЗ, так и ХОБЛ. Роль цитокинов, участвующих в ангиогенезе, в формировании патологии сердечно-сосудистой системы и ХОБЛ представляется весьма существенной [7, 8]. В литературе описаны исследования об ассоциации полиморфизма гена фактора роста эндотелия сосудов *VEGFA* и гена *KDR*, кодирующего рецептор к *VEGFA*, с ССЗ, однако данное направление требует дальнейшего изучения [9–11].

Цель данного исследования — оценить влияние полиморфных вариантов rs699947, rs3025039, rs2010963 гена *VEGFA* и rs1870377 гена *KDR* на риск развития ХОБЛ и ИБС у мужчин.

Материалы и методы

В исследование включены 100 лиц мужского пола с диагнозом ХОБЛ (J44). Пациенты с ХОБЛ включались в исследование в периоде ремиссии, в срок не менее трех месяцев после завершения обострения ХОБЛ. Медиана (25 и 75 квартили) возраста пациентов с ХОБЛ составила 65,0 [60,0:69,0] лет. В качестве групп сравнения в исследование включены две группы пациентов без ХОБЛ: 100 пациентов с установленным диагнозом ИБС (66,0 [63,06:69,0] лет) и 109 мужчин-долгожителей (ДЖ) в возрасте старше 92,0 [91,0:93,0] лет. В таблице 1 представлены характеристики включенных в исследование пациентов.

Группа пациентов с ИБС имела следующие формы заболевания: перенесенный в прошлом инфаркт миокарда (I25.2), бессимптомная ишемия миокарда (I25.6), стенокардия напряжения (I20.8). У пациентов с ИБС, включенных в исследование, наличие ХОБЛ исключено на этапе предварительного обследования.

Контрольной группой являлись 109 мужчин-долгожителей в возрасте старше 92,0 [91,0:93,0] лет, не имеющих в анамнезе острого инфаркта миокарда, острого нарушения мозгового кровообращения, клинически выраженной хронической сердечной недостаточности и без установленного клинического диагноза ХОБЛ. Необходимо отметить, что в возрастной категории от 60 до 70 лет практически невозможно найти людей без коморбидной патологии. К тому же отсутствие клинических критериев хронических заболеваний, таких как ИБС или ХОБЛ, на момент обследования не исключает их появления в обозримом будущем по мере старения пациента. Данная проблема в исследованиях, включающих возрастных пациентов, различными авторами обозначается как «ограничение исследования». Долгожители представляют собой группу людей, которые достигли зрелого возраста без значительных хронических болезней либо хронические заболевания не помешали им дожить до возраста долгожителей. ДЖ демонстрируют тем самым генетическую и/или физиологическую устойчивость к развитию хронических заболеваний, особенно таких, которые влияют на продолжительность жизни человека, например, ИБС или ХОБЛ. Поэтому использование группы долгожителей в качестве группы сравнения в биомедицинских исследованиях может помочь выявить генетические, метаболические или другие биологические факторы, которые играют роль не только в развитии, но и течении хронических болезней. Так, Т. Ю. Маркова с соавторами рассматривают феномен долгожительства как состояние максимально возможной защиты от формирования и прогрессирования ИБС, а долгожителей — как перспективную категорию населения для выявления антиатерогенных факторов и механизмов [12].

Диагноз ХОБЛ выставлялся в соответствии с рекомендациями Глобальной стратегии диагностики, лечения и профилактики ХОБЛ [13] на основании изучения жалоб, анамнеза воз-

Таблица 1

Характеристика включенных в исследование пациентов

Заболевание	ИБС	ХОБЛ	Долгожители
Число пациентов, N	100	100	109
Пол	мужской	мужской	мужской
Возраст, лет Me (25–75%)	66,0 [63,0:69,0]	65,0 [60,0:69,0]	92,0 [91,0:93,0]

действия поллютантов (курение) на органы дыхания, физикального осмотра, изучения функции внешнего дыхания (ФВД) после ингаляции короткодействующего бронхолитика (сальбутамол 400 мкг). Диагноз ИБС выставлялся на основании изучения жалоб, анамнеза, физикального осмотра, функциональных методов исследования в соответствии с рекомендациями Европейского общества кардиологов [14].

Геномную ДНК из лейкоцитов периферической венозной крови выделяли методом фенольно-хлороформной экстракции с использованием протеиназы К с последующей очисткой этанолом. Четыре однонуклеотидных полиморфизмов (ОНП) генов *VEGFA* и *KDR* были выбраны для анализа на основе частоты минорных аллелей (MAF) не менее 5% в европейской популяции (ЕП). Основная информация о протестированных вариантах представлена в таблице 2.

Полиморфные варианты rs699947, rs3025039, rs2010963 гена *VEGFA* и rs1870377 гена *KDR*

Таблица 2

Основная информация об изучаемых однонуклеотидных полиморфизмах генов *VEGFA* и *KDR*

Полиморфный локус	Локализация*	Нуклеотидная замена	MAF**	Частоты генотипов в ЕП***
rs699947	chr6:43768652	2578A > C	C = 0,4477	AA 0,305; CA 0,495; CC 0,20
rs3025039	chr6:43784799	936C > T	T = 0,13905	CC 0,741; CT 0,24; TT 0,019
rs2010963	chr6:43770613	634G > C	C = 0,3302	GG 0,449; GC 0,442; CC 0,109
rs1870377	chr4:55106807	1719T > A	A = 0,23956	TT 0,578; TA 0,364; AA 0,058

Примечание. * — на основе референсной последовательности человека (GRCh38.p13); ** — MAF — частота минорного аллеля в европейской популяции [15]; *** — частоты встречаемости гомозиготных и гетерозиготных генотипов изучаемых генов рассчитывались по формуле $(p + q)^2$, отражающей закон Харди-Вайнберга (p — распространенность в ЕП первого аллеля изучаемой аллельной пары, q — распространенность в ЕП второго аллеля изучаемой аллельной пары)

определяли методом ПЦР-ПДРФ анализа. Полимеразную цепную реакцию проводили на амплификаторе C1000 Touch (BioRad, США). Праймеры, использованные в работе, синтезировались ОДО «Праймтех», Беларусь.

Статистическую обработку результатов осуществляли посредством программного обеспечения IBM Statistica (версия 10). Описательная статистика представлена медианой и интерквартильным размахом — Me [25:75]. Для сравнения частот встречаемости аллелей или генотипов в различных группах использовался анализ таблиц сопряженности с расчетом критерия χ^2, связанного с ним критерия z, точного критерия Фишера (если ожидаемые значения в ячейках таблицы были меньше пяти), отношения шансов (ОШ) с расчетом 95% ДИ. За пороговый уровень критической значимости принимали значение вероятности менее 0,05 ($p < 0,05$). Полиморфные варианты изучаемых генов тестировали на отклонение от равновесия Харди-Вайнберга (HWEp >0,05).

Сравнительный анализ распределения частот генотипов и аллелей четырех однонуклеотидных полиморфизмов генов *VEGFA* и *KDR* в группе ДЖ, у пациентов с ИБС и пациентов с ХОБЛ проводился с помощью онлайн-программы SNPStats [16], в основу работы которой положено использование логистической регрессии для создания моделей взаимодействия аллелей генов (кодоминантной, доминантной, рецессивной, сверхдоминантной, лог-аддитивной). Оценка отношения шансов (ОШ) для каждого генотипа по отношению к референсному генотипу, за которую выбирается один гомозиготный генотип, дает представление о степени ассоциации заболевания с тем или иным генотипом у лиц исследуемых групп. Для определения неравновесия сцепления онлайн-программа SNPStats рассчитывает статистику D, которая представляет собой отклонение между ожидаемой частотой гаплотипов (в предположении отсутствия ассоциации) и наблюдаемой частотой, статистику D', кото-

рая равна D, масштабированной в диапазоне [–1,1], коэффициент корреляции между аллелями r. Между неравновесно сцепленными аллелями проведена оценка частот гаплотипов с помощью двухэтапного итерационного метода, названного EM-алгоритмом (Expectation Maximization algorithm). Оценка отношения шансов (ОШ) для каждого гаплотипа по отношению к референсному, за который выбирается наиболее часто встречающийся гаплотип, дает представление о степени ассоциации заболевания с тем или иным гаплотипом у лиц исследуемых групп.

Результаты и обсуждение

Фактор роста эндотелия сосудов VEGF играет центральную роль в развитии как физиологического, так и патологического ангиогенеза. Семейство VEGF у человека включает пять представителей, из которых VEGFA — митоген, ответственный за ангиогенез и стимуляцию пролиферации эндотелиальных клеток [7]. Описан ряд однонуклеотидных полиморфизмов гена *VEGFA*, влияющих на уровень продукции фактора роста эндотелия сосудов. Установлено, что генотипы 2578AA rs699947 и 634GG rs2010963 связаны со снижением синтеза VEGFA в мононуклеарных клетках периферической крови, стимулированных липополисахаридом [17, 18]. У носителей аллели +936T rs3025039 наблюдается снижение уровня VEGFA в плазме крови [19]. Ключевым рецептором, через который осуществляется передача сигнала от VEGFA внутрь клетки, является VEGFR2, который кодируется геном *KDR*. Вариант однонуклеотидной замены 1719A > T расположен в 11-ом экзоне гена, что соответствует 5-му Ig-подобному домену рецептора. Этот вариант приводит к несинонимичной замене аминокислоты, что влияет на эффективность связывания VEGFA с VEGFR2 [20].

На первом этапе проведена оценка частот встречаемости генотипов и аллелей rs699947, rs3025039, rs2010963 гена *VEGFA* и rs1870377 гена *KDR* в исследуемых группах (табл. 3).

Распределение частот аллелей и генотипов исследуемых локусов соответствовало равновесию Харди-Вайнберга, за исключением полиморфного варианта rs699947 в группе ХОБЛ ($\chi^2 = 7,6$; $p = 0,006$). С учетом соответствия закону Харди-Вайнберга распределений генотипов rs3025039, rs3025039, rs1870377 в группе пациентов с ХОБЛ неслучайный отбор пациентов при формировании группы представляется маловероятным. Исключены также ошибки генотипирования. Возможно, причиной несоответствия закону Харди-Вайнберга рас-

Таблица 3

Частоты встречаемости генотипов и аллелей rs699947, rs3025039, rs2010963 и rs1870377 у пациентов с ХОБЛ, ИБС и у долгожителей Беларуси

Генотип	Долгожители		Пациенты с ИБС		Пациенты с ХОБЛ	
	n	%	n	%	n	%
rs699947						
AA	34	32,7	24	24,0	19	19,6
CA	49	47,1	46	46,0	62	63,9
CC	21	20,2	30	30,0	16	16,5
Аллель A	117	56,3	94	47,0	100	51,5
Аллель C	91	43,7	106	53,0	94	48,5
HWEp	0,65		0,44		**0,006**	
rs3025039						
CC	63	63,0	65	65,0	70	72,2
TC	36	36,0	31	31,0	27	27,8
TT	1	1,0	4	4,0	0	0,0
Аллель C	162	81,0	161	80,5	167	86,1
Аллель T	38	19,0	39	19,5	27	13,9
HWEp	0,09		0,83		0,11	

Окончание таблицы 3

Генотип	Долгожители		Пациенты с ИБС		Пациенты с ХОБЛ	
	n	%	n	%	n	%
rs2010963						
GG	59	59,6	40	40,0	44	46,8
GC	35	35,4	48	48,0	46	48,9
CC	5	5,0	12	12,0	4	4,3
Аллель G	153	77,3	128	64,0	134	71,3
Аллель C	45	22,7	72	36,0	54	28,7
HWEp	0,91		0,68		0,06	
rs1870377						
TT	51	46,8	51	51,0	49	49,0
TA	45	41,3	43	43,0	38	38,0
AA	13	11,9	6	6,0	13	13,0
Аллель T	147	67,4	145	72,5	136	68,0
Аллель A	71	32,6	55	27,5	64	32,0
HWEp	0,52		0,43		0,2	

пределений генотипов rs699947 является влияние данного ОНП на формирование ХОБЛ: в группе ХОБЛ частота встречаемости гетерозиготы CA (63,9%) статистически значимо превышает таковую в группах ИБС (46,0%) и ДЖ (47,1%), уровень значимости p = 0,01 и p = 0,02 соответственно.

Далее проведен сравнительный анализ распределения частот аллелей и генотипов полиморфизмов гена *VEGFA* и *KDR* в группе ДЖ, у пациентов с ИБС и пациентов с ХОБЛ с использованием логистической регрессии для создания моделей взаимодействия аллелей генов (кодомининтной, доминантной, рецессивной, сверхдоминантной, лог-аддитивной). Данные приведены в таблице 4. В каждой модели рассчитано отношение шансов (ОШ) и 95%-й доверительный интервал (95% ДИ) при сравнении пациентов исследуемых групп (лиц с ИБС, с ХОБЛ, ДЖ). Для выбора лучшей модели использовалось наименьшее значение статистики Акаике (AIC).

Не выявлено различий между группами по распределению полиморфных вариантов rs3025039 гена *VEGFA* и rs1870377 гена *KDR*.

Статистически значимые различия полиморфных вариантов rs2010963 гена *VEGFA* выявлены между группой пациентов с ИБС и ДЖ: частота встречаемости генотипа GG rs2010963 в группе ДЖ (59,6%) статистически значимо выше, чем в группе ИБС (40,0%), p = 0,01. Носительство генотипов CC и GC достоверно чаще наблюдалось в группе пациентов с ИБС по сравнению с ДЖ (ОШ 2,2; 95% ДИ: 1,3–3,9). Лучшей моделью наследования (AICmin = 271) явилась лог-аддитивная модель (ОШ = 2,0; 95% ДИ: 1,2–3,0; p = 0,003).

Наши результаты показывают, что у носителей алелли C (генотипы CC и GC) rs2010963 повышен риск развития ИБС. Схожие результаты были получены в 2017 г. K. S. Nia и соавторами в результате 5-летнего наблюдения за пациентами с ИБС. Авторы установили, что носительство генотипов CC/CG rs2010963 увеличивает риск развития ИБС (p = 0,002) и риск сердечно-сосудистой смерти (p = 0,004) [9]. Также проведенный метаанализ показал, что генотип CC, связанный с высоким уровнем сывороточного VEGF, может повышать риск инфаркта миокарда [11]. Хотя роль VEGFA в атеросклеротических изменениях остается неоднозначной в литературе, большинство предыдущих исследований сообщали, что роль VEGFA в прогрессировании ИБС может быть связана с ангиогенезом и вазоактивационной активностью, пролиферацией гладкомышечных клеток. Также VEGFA действует как эндогенный медиатор в эндотелиальном сигнальном пути и регулятор целостности эндотелия в артериальной стенке [21, 22].

Таблица 4

Сравнение распределения полиморфных вариантов генов *VEGFA* и *KDR* у долгожителей, пациентов с ИБС и пациентов с ХОБЛ с использованием логистической регрессии

Модель	Генотип	Группы			Отношение шансов (ОШ)			p			AIC		
		ДЖ чел. (%)	ИБС чел. (%)	ХОБЛ чел. (%)	ИБС–ДЖ (1)	ХОБЛ–ДЖ (2)	ХОБЛ–ИБС (3)	1	2	3	1	2	3
rs699947													
Кодоминантная	AA CA CC	34 (32,7) 49 (47,1) 21 (20,2)	24 (24,0) 46 (46,0) 30 (30,0)	19 (19,6) 62 (63,9) 16 (16,5)	1,0 1,3 (0,7–2,6) 2,0 (0,9–4,3)	1,0 2,3 (1,2–4,5) 1,4 (0,6–3,2)	1,0 2,5 (1,2–5,2) 1,5 (0,6–3,5)	0,2	0,04	0,03	285	278	271
Доминантная	AA CA–CC	34 (32,7) 70 (67,3)	24 (24,0) 76 (76,0)	19 (19,6) 78 (80,4)	1,0 1,5 (0,8–2,8)	1,0 2,0 (1,1–3,8)	1,0 1,3 (0,7–2,6)	0,2	0,03	0,45	284	278	276
Рецессивная	AA–CA CC	83 (79,8) 21 (20,2)	70 (70,0) 30 (30,0)	81 (83,5) 16 (16,5)	1,0 1,7 (0,9–3,2)	1,0 0,8 (0,4–1,6)	1,0 0,5 (0,2–0,9)	0,1	0,5	0,02	284	282	272
Сверхдоминантная	AA–CC CA	55 (52,9) 49 (47,1)	54 (54,0) 46 (46,0)	35 (36,1) 62 (63,9)	1,0 0,9 (0,6–1,7)	1,0 2,0 (1,1–3,5)	1,0 2,1 (1,2–3,7)	0,9	0,02	0,01	286	277	270
Лог-аддитивная	–	–	–	–	1,4 (0,9–2,1)	1,24 (0,8–1,9)	1,22 (0,8–1,9)	0,07	0,3	0,34	283	281	272
rs3025039													
Кодоминантная	CC TC TT	63 (63,0) 36 (36,0) 1 (1,0)	65 (65,0) 31 (31,0) 4 (4,0)	70 (72,2) 27 (27,8) 0 (0,0)	1,0 0,8 (0,5–1,5) 3,9 (0,4–35,6)	1,0 0,7 (0,4–1,2) –	1,0 0,8 (0,4–1,5) –	0,3	0,2	0,051	281	176	273
Доминантная	CC TC–TT	63 (63,0) 37 (37,0)	65 (65,0) 35 (35,0)	70 (72,2) 27 (27,8)	1,0 0,9 (0,5–1,6)	1,0 0,7 (0,4–1,2)	1,0 0,7 (0,4–1,3)	0,8	0,2	0,3	281	275	276
Рецессивная	CC–TC TT	99 (99,0) 1 (1,0)	96 (96,0) 4 (4,0)	97 (100,0) 0 (0,0)	1,0 4,1 (0,5–37,5)	1,0 –	1,0 –	0,2	0,2	–	279	276	272
Сверхдоминантная	CC–TT TC	64 (64,0) 36 (36,0)	69 (69,0) 31 (31,0)	70 (72,2) 27 (27,8)	1,0 0,8 (0,4–1,4)	1,0 0,7 (0,4–1,3)	1,0 0,9 (0,5–1,6)	0,5	0,2	0,6	281	276	277
Лог-аддитивная	–	–	–	–	1,04 (0,6–1,7)	0,6 (0,4–1,2)	0,7 (0,4–1,1)	0,9	0,1	0,1	281	275	275

Окончание таблицы 4

Модель	Генотип	Группы			Отношение шансов (ОШ)			p			AIC		
		ДЖ чел. (%)	ИБС чел. (%)	ХОБЛ чел. (%)	ИБС–ДЖ (1)	ХОБЛ–ДЖ (2)	ХОБЛ–ИБС (3)	1	2	3	1	2	3
rs2010963													
Кодоминантная	GG GC CC	59 (59,6) 35 (35,4) 5 (5,0)	40 (40,0) 48 (48,0) 12 (12,0)	44 (46,8) 46 (48,9) 4 (4,3)	1,0 2,0 (1,1–3,7) 3,5 (1,6–10,8)	1,0 1,8 (1,0–3,2) 1,1 (0,3–4,2)	1,0 0,9 (0,5–1,6) 0,3 (0,1–1,1)	0,01	0,2	0,12	273	270	271
Доминантная	GG GC–CC	59 (59,6) 40 (40,4)	40 (40,0) 60 (60,0)	44 (46,8) 50 (53,2)	1,0 2,2 (1,3–3,8)	1,0 1,7 (1,0–3,2)	1,0 0,8 (0,4–1,3)	0,01	0,08	0,34	272	268	272
Рецессивная	GG–GC CC	94 (95,0) 5 (5,0)	88 (88,0) 12 (12,0)	90 (95,7) 4 (4,3)	1,0 2,6 (0,8–7,6)	1,0 0,8 (0,2–3,2)	1,0 0,33 (0,1–1,1)	0,08	0,8	0,089	277	271	269
Сверхдоминантная	GG–CC GC	64 (64,7) 35 (35,4)	52 (52,0) 48 (48,0)	48 (51,1) 46 (48,9)	1,0 1,7 (0,96–2,98)	1,0 1,8 (0,98–3,1)	1,0 1,1 (0,6–1,8)	0,07	0,06	0,9	277	268	273
Лог-аддитивная	–	–	–	–	1,9 (1,2–3,1)	1,4 (0,9–2,3)	0,7 (0,4–1,1)	0,003	0,15	0,1	271	269	270
rs1870377													
Кодоминантная	TT TA AA	51 (46,8) 45 (41,3) 13 (11,9)	51 (51,0) 43 (43,0) 6 (6,0)	49 (49,0) 38 (38,0) 13 (13,0)	1,0 0,96 (0,5–1,7) 0,5 (0,2–1,3)	1,0 0,9 (0,5–1,6) 1,04 (0,4–2,5)	1,0 0,9 (0,5–1,7) 2,3 (0,6–1,9)	0,32	0,89	0,22	293	295	280
Доминантная	TT TA–AA	51 (46,8) 58 (53,2)	51 (51,0) 49 (49,0)	49 (49,0) 51 (51,0)	1,0 0,8 (0,5–1,5)	1,0 0,9 (0,5–1,6)	1,0 1,1 (0,6–1,9)	0,54	0,75	0,78	293	293	281
Рецессивная	TT–TA AA	96 (88,1) 13 (11,9)	94 (94,0) 6 (6,0)	87 (87,0) 13 (13,0)	1,0 0,5 (0,7–1,3)	1,0 1,1 (0,5–2,5)	1,0 2,3 (0,9–6,4)	0,13	0,81	0,09	291	293	278
Сверхдоминантная	TT–AA TA	96 (88,1) 13 (11,9)	57 (57,0) 43 (43,0)	62 (62,0) 38 (38,0)	1,0 1,1 (0,6–1,9)	1,0 0,9 (0,5–1,5)	1,0 0,8 (0,5–1,4)	0,8	0,63	0,47	293	293	281
Лог-аддитивная	–	–	–	–	0,8 (0,5–1,2)	0,98 (0,7–1,5)	1,2 (0,8–1,9)	0,26	0,91	0,33	292	293	280

Статистически значимые различия по частотам генотипов rs699947 гена *VEGFA* обнаружены между группой лиц с ХОБЛ и ДЖ. Лучшей моделью наследования (AICmin = 277) явилась сверхдоминантная модель: доля носителей гетерозиготного генотипа CA rs699947 в группе пациентов с ХОБЛ статистически значимо больше по сравнению с ДЖ (CA vs CC–AA: ОШ = 2,0; 95% ДИ: 1,1–3,5; p = 0,02). Статистически значимые различия по частотам генотипов rs699947 обнаружены между пациентами с ХОБЛ и пациентами с ИБС. Лучшей моделью наследования (AICmin = 270) также явилась сверхдоминантная модель: доля носителей гетерозиготного генотипа CA rs699947 в группе пациентов с ХОБЛ статистически значимо больше по сравнению с группой лиц с ИБС (CA vs CC–AA: ОШ = 2,1; 95% ДИ: 1,2–3,7; p = 0,01). Преобладание генотипа CA rs699947 в группе пациентов с ХОБЛ по сравнению с ДЖ и группой пациентов с ИБС, возможно, связано с явлением сверхдоминирования, и именно это привело к несоответствию распределений генотипов rs699947 закону Харди-Вайнберга в группе ХОБЛ.

В доступной литературе есть данные только одного исследования, где изучалась связь rs699947 *VEGFA* с риском ХОБЛ. В данном исследовании не выявлено статистических различий по частотам полиморфных вариантов rs699947 в группе ХОБЛ и контрольной группе [23]. В то же время в мета-анализе W. Q. Ma и соавторов выявлен повышенный риск предрасположенности к ИБС в доминирующей генетической модели (CC + CA против AA: ОШ = 1,38; 95% ДИ: 1,19–1,61) [24].

В нашем исследовании выявлено статистически достоверно более частое носительство генотипа AA rs699947 у ДЖ по сравнению с пациентами группы ХОБЛ (p = 0,036). Статистически значимой разницы между пациентами группы ИБС и группы ХОБЛ по носительству генотипа AA rs699947 не получено. Т. к. ИБС и ХОБЛ формируются в условиях практически одинаковых факторов риска, вероятно, генотип AA rs699947 ассоциирован с ангиопротективным действием. У лиц с ХОБЛ носительство генотипа CC rs699947 выявлено статистически значимо реже по сравнению с пациентами с ИБС (p = 0,026), а носительство генотипа CA rs699947 чаще по сравнению с пациентами с ИБС (p = 0,012) и ДЖ (p = 0,017). Это приводит к преоблада-

Таблица 5

Статистическая оценка неравновесия по сцеплению пар полиморфных вариантов гена *VEGFA* в группах пациентов с ХОБЛ, с ИБС и ДЖ

Пары ОНП	D	D`	r	χ^2	p
Группы ХОБЛ–ДЖ					
rs699947–rs3025039	0,023	0,305	0,125	6,07	0,014
rs699947–rs2010963	0,116	0,836	0,532	107,9	<0,001
rs3025039–rs2010963	0,007	0,057	0,043	0,39	0,52
Группы ИБС–ДЖ					
rs699947–rs3025039	0,012	0,136	0,064	1,63	0,20
rs699947–rs2010963	0,125	0,821	0,548	118,3	<0,001
rs3025039–rs2010963	0,009	0,070	0,053	1,08	0,29
Группы ХОБЛ–ИБС					
rs699947–rs3025039	0,002	0,030	0,014	0,07	0,78
rs699947–rs2010963	0,125	0,779	0,532	109,9	<0,001
rs3025039–rs2010963	0,006	0,053	0,034	0,46	0,499

нию в группе ХОБЛ носительства генотипа CA rs699947 в возрасте 65,0 [60,0:69,0] лет. Вероятно, генотип CA rs699947 является неблагоприятным для достижения возраста долголетия (90 лет и старше) пациентами с ХОБЛ.

На следующем этапе проведено изучение неравновесия по сцеплению изучаемых полиморфных вариантов гена *VEGFA* в группах пациентов с ХОБЛ, с ИБС и ДЖ (табл. 5).

Во всех изучаемых группах выявлено статистически значимое сцепление между ОНП rs699947 и rs2010963 гена *VEGFA* (значения коэффициента корреляции между аллелями r 0,532–0,548; p <0,001).

При анализе комбинаций полиморфных вариантов изучаемых локусов на первом этапе были исключены сочетания аллелей, частота которых была менее 0,01. В таблице 6 представлены статистически значимые различия по частотам сочетаний аллелей изучаемых локусов в исследуемых группах. Анализ комбинаций между группами пациентов с ХОБЛ и ДЖ не выявил статистически значимых различий. Таким образом, в группе ХОБЛ следует считать приоритетным ассоциацию генотипа CA rs699947 гена *VEGFA* с риском развития ХОБЛ (табл. 3).

Сочетание аллелей C–C (rs699947–rs2010963) в группе пациентов с ИБС (32,0%) встречается статистически значимо чаще (ОШ 2,0; 95% ДИ: 1,2–3,2; p = 0,006), чем в группе ДЖ (20,7%).

Сочетание аллелей C–T (rs2010963–rs1870377) в группе пациентов с ИБС (30,2%) встречается статистически значимо чаще, чем в группе ДЖ (17,0%) и в группе ХОБЛ (18,8%) (ОШ 2,4; 95% ДИ: 1,3–4,5; p = 0,007 и ОШ 2,2; 95% ДИ: 1,1–4,3; p = 0,024 соответственно).

Сочетание аллелей C–C–T (rs699947–rs2010963–rs1870377) в группе пациентов с ИБС (26,2%) встречается статистически значимо чаще, чем в группе ДЖ (15,7%) и в группе ХОБЛ (16,5%) (ОШ 2,3; 95% ДИ: 1,1–4,5; p = 0,02 и ОШ 2,7; 95% ДИ: 1,2–5,9; p = 0,016 соответственно).

Таким образом, полученные данные позволяют предполагать влияние носительства сочетание аллелей C–T (rs2010963–rs1870377) и C–C–T (rs699947–rs2010963–rs1870377) в формировании предрасположенности к развитию ИБС.

Таблица 6

Статистически значимые различия встречаемости сочетаний аллелей изучаемых локусов генов *VEGFA* и *KDR* в группах долгожителей, пациентов с ИБС и с ХОБЛ, полученные с помощью EM-алгоритма

Полиморфизмы			Частоты в группах, %		ОШ (95% ДИ)	p
rs699947	rs2010963	rs1870377	ИБС	ДЖ		
A	G	–	43,2	54,8	1,0	–
C	C	–	32,2	20,7	2,0 (1,2–3,2)	0,006
–	G	T	42,3	50,5	1,0	–
–	C	T	30,2	17,0	2,4 (1,3–4,5)	0,007
A	G	T	27,6	35,3	1,0	–
C	C	T	26,2	15,7	2,3 (1,1–4,5)	0,02
Полиморфизмы			**Частоты в группах, %**		**ОШ (95% ДИ)**	**p**
rs699947	**rs2010963**	**rs1870377**	**ИБС**	**ХОБЛ**		
–	G	T	43,2	49,2	1,0	–
–	C	T	30,2	18,8	2,2 (1,1–4,3)	0,024
A	G	T	27,6	35,8	1,0	–
C	C	T	26,2	16,5	2,7 (1,2–5,9)	0,016

Заключение

Таким образом, в исследуемых группах выявлено, что доля носителей гомозиготного генотипа CC rs699947 гена *VEGFA* в группе пациентов с ХОБЛ статистически значимо меньше по сравнению с группой пациентов с ИБС. Доля носителей гетерозиготного генотипа CA rs699947 гена *VEGFA* в группе пациентов с ХОБЛ статистически значимо больше по сравнению с долгожителями и по сравнению с группой пациентов с ИБС. Можно предположить, что генотип CA rs699947 является неблагоприятным для достижения возраста долголетия (92 года и старше) пациентами с ХОБЛ. Данная гипотеза нуждается в дополнительном исследовании для ее подтверждения.

Наши результаты показывают, что у носителей аллели C (генотипы CC и GC) rs2010963 гена *VEGFA* повышен риск развития ИБС: пациенты с генотипами CC и GC достоверно чаще наблюдались в группе с ИБС по сравнению с долгожителями.

Выявлено статистически значимое неравновесное сцепление между локусами rs699947 и rs2010963 во всех изучаемых группах (r 0,532–0,548; p <0,001). Сочетание аллелей C–T (rs2010963–rs1870377) в группе пациентов с ИБС встречается статистически значимо чаще, чем в группе ДЖ и в группе ХОБЛ. Сочетание аллелей C–C–T (rs699947–rs2010963–rs1870377) в группе пациентов с ИБС встречается статистически значимо чаще, чем в группе ДЖ и ХОБЛ. Полученные данные позволяют предполагать участие выявленных гаплотипов в формировании предрасположенности к развитию ИБС.

Список использованных источников

1. World health organization. The top 10 causes of death [Electronic resource]. – Mode of access: https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death, 2020. – Date of access: 18.05.2023.

2. GBD Chronic Respiratory Disease Collaborators. Prevalence and attributable health burden of chronic respiratory diseases, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017 // Lancet Respir Med. – 2020. – Vol. 8. – P. 585–596.

3. The global economic burden of noncommunicable diseases (Online) / Bloom DE. [Electronic resource]. – 2011. – Режим доступа: https://www.weforum.org/reports/global-economic-burden-non-communicable-diseases. – Дата доступа: 08.12.2022.

4. COPD and its comorbidities: Impact, measurement and mechanisms. / Negewo NA [et al.] // Respirology. – 2015. – Vol. 20, № 8. – P. 1 160–1 171.

5. Heart failure and chronic obstructive pulmonary disease: a review / Horodinschi RN [et al.] // Acta Cardiol. – 2020. – Vol. 75, № 2. – P. 97–104.

6. Heart failure and chronic obstructive pulmonary disease: the challenges facing physicians and health services / N. M. Hawkins [et al.] // Eur Heart J. – 2013. – Vol. 34. – P. 2 795–2 803.

7. Angiogenesis, Lymphangiogenesis, and Inflammation in Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD): Few Certainties and Many Outstanding Questions [Electronic resource] / R. Poto [et al.] // Cells. – 2022. – Vol. 23:1720. – Mode of access: DOI:10.3390/cells11101720. – Date of access: 30.09.2024.

8. Vascular endothelial growth factor (VEGF)-A: role on cardiac angiogenesis following myocardial infarction / T. Zhao [et al.] // Microvascular Research. – 2010. – Vol. 80(2). – P. 188–194.

9. The impact of vascular endothelial growth factor +405 C/G polymorphism on long-term outcome and severity of coronary artery disease [Electronic resource] / K. S. Nia [et al.] // J Clin Lab Anal. – 2017. – Vol. 31, № 4. – e22066. – Mode of access: DOI:10.1002/jcla.22066. – Date of access: 30.09.2024.

10. Медведева, М. В. Ассоциации полиморфных вариантов rs2305948 и rs1870377 гена рецептора фактора роста сосудистого эндотелия 2 типа (*KDR*) с риском развития ишемической болезни сердца / М. В. Медведева // Научные результаты биомедицинских исследований. – 2021. – № 1. – С. 32–43.

11. Vascular endothelial growth factor A polymorphisms are associated with increased risk of coronary heart disease: a meta-analysis / Yafeng Wang [et al.] // Oncotarget. – 2017. – Vol. 8, № 18. – P. 30 539–30 551.

12. Маркова, Т. Ю. Ишемическая болезнь сердца и долгожительство: неразгаданные вопросы / Т. Ю. Маркова, Л. И. Малинова, Т. П. Денисова // Саратовский научно-медицинский журнал. – 2015. – Т. 11. – С. 37–41.

13. Global Strategy for the Diagnosis, Management and Prevention of Chronic obstructive pulmonary disease (2023 Report) [Electronic resource]. – Mode of access: https://goldcopd.org/wp-content/uploads/2023/03/GOLD-2023-ver-1.3-17Feb2023_WMV.pdf. – Date of access: 15.03.2024.

14. 2019 ESC Guidelines for the diagnosis and management of chronic coronary syndromes / J. Knuuti [et al.] // European Heart Journal. – 2020. – Vol. 41, № 3. – P. 407–477.

15. The National Center for Biotechnology Information [Electronic resource]. – Mode of access: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/. – Date of access: 15.03.2024.

16. SNPStats [Electronic resource]. – Mode of access: https://www.snpstats.net/start.htm. – Date of access: 15.03.2024.

17. Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms are associated with acute renal allograft rejection / M. Shahbazi [et al.] // J. Am. Soc. Nephrol. – 2002. – Vol. 13, № 1. – P. 260–264.

18. Functional VEGF C-634G polymorphism is associated with development of diabetic macular edema and correlated with macular retinal thickness in type 2 diabetes / T. Awata [et al.] // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2005. – Vol. 333. – P. 679–685.

19. A common 936 C/T gene polymorphism of vascular endothelial growth factor is associated with decreased breast cancer risk / P. Krippl [et al.] // Int. J. Cancer. – 2003. – Vol. 106, № 4. – P. 468–471.

20. Association of genetic polymorphisms on *VEGFA* and *VEGFR2* with risk of coronary heart disease [Electronic resource] / D. Liu [et al.] // Medicine. – 2016. – Vol. 95, № 19. – P. e3413. – Mode of access: DOI:10.1097/MD.0000000000003413. – Date of access: 30.09.2024.

21. Vascular endothelial growth factor genetic variability and coronary artery disease in Brazilian population / P. M. Biselli [et al.] // Heart Vessels. – 2008. – Vol. 23. – P. 371–375.

22. Vascular endothelial growth factor biology for regenerativeangiogenesis [Electronic resource] / A. Uccelli [et al.] // Swiss Med Wkly. – 2019. – Vol. 27; 149: w20011. – Mode of access: DOI:10.4414/smw.2019.20011. – Date of access: 30.09.2024.

23. The association of genetic polymorphisms of hypoxia inducible factor-1 alpha and vascular endothelial growth factor with increased risk of chronic obstructive pulmonary disease: A case-control study / Z. G. Yu [et al.] // Kaohsiung J Med Sci. – 2017. – Vol. 33, № 9. – P. 433–441.

24. Association of genetic polymorphisms in vascular endothelial growth factor with susceptibility to coronary artery disease: a meta-analysis [Electronic resource] / W. Q. Ma [et al.] // BMC Med Genet. – 2018. – Vol. 19, № 1:108. – Mode of access: DOI:10.1186/s12881-018-0628-3. – Date of access: 30.09.2024.

A. P. Mikhalenka[1], D. V. Lapitski[2], Yu. V. Polyukhovich[1], N. P. Mitkovskaya[2], A. V. Kilchevsky[1]

ANALYSIS OF THE POLYMORPHIC VARIANTS OF *VEGFA*, *KDR* GENES AND THEIR HAPLOTYPES IN PATIENTS WITH ISCHEMIC HEART DISEASE AND CHRONIC OBSTRUCTIVE PULMONARY DISEASE

[1]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.michalenko@igc.by
[2]Educational Establishment
"Belarusian Medical University"
83 Dzerzhinsky Ave., 220116 Minsk, the Republic of Belarus

Cardiovascular diseases (CVDs) and chronic obstructive pulmonary disease (COPD) are among the top five causes of death across the globe. In recent years, an increasing number of studies examining a genetic predisposition to the development and course of both CVDs and COPD have come to light. This study aimed to assess the impact of polymorphic variants rs699947, rs3025039, rs2010963 of the *VEGFA* gene and rs1870377 of the *KDR* gene on the risk of chronic obstructive pulmonary disease and ischemic heart disease in men.

The influence of the heterozygous genotype CA rs699947 of the *VEGFA* gene on the risk of a predisposition to COPD was revealed: the proportion of CA genotype carriers in the group of patients with COPD is statistically significantly higher compared to the long livers (CA vs CC–AA: OR = 2.0; (1.1–3.5); p = 0.02); patients with ischemic heart disease (SA vs SS–AA: OR = 2.1 (1.2–3.7); p = 0.01). The carriage of the CC and GC genotypes rs2010963 of the VEGFA gene was statistically more often observed in the group of patients with ischemic heart disease compared to the long livers of Belarus. Statistically significant linkage disequilibrium was revealed between the rs699947 and rs2010963 loci of the *VEGFA* gene in all the studied groups (r 0.532–0.548; p <0.001). The influence of allelic combinations C–T (rs2010963–rs1870377) and C–C–T (rs699947–rs2010963–rs1870377) on the formation of a predisposition to the development of ischemic heart disease was shown.

Keywords: gene polymorphism, vascular endothelial growth factor, chronic obstructive pulmonary disease, ischemic heart disease, long livers.

Дата поступления в редакцию: 09 июля 2024 г.

УДК 616-006.66:575.113.3:575.176

В. Н. Кипень[1], А. О. Хоров[2], В. А. Лемеш[1], Е. И. Ходоронок[2], А. А. Буракова[1], О. И. Добыш[1]

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ СТАТУС ПАЦИЕНТОВ С ТРИЖДЫ НЕГАТИВНЫМ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ПО РЕЗУЛЬТАТАМ KASP-ГЕНОТИПИРОВАНИЯ

[1]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
[2]Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии им. Н. Н. Александрова»
Республика Беларусь, 223040, Минский район, аг. Лесной

Проведены молекулярно-генетические исследования для 90 пациентов с клинически верифицированным диагнозом ТНРМЖ (трижды негативный рак молочной железы), определены частоты минорных аллелей по 26 полиморфизмам (rs11615, rs6896596, rs1154121, rs2235035, rs241430, rs241429, rs17205838, rs35596, rs4919395, rs1008805, rs2740574, rs4680, rs1695, rs13181, rs1042522, rs1801516, rs2279744, rs861539, rs2231137, rs25487, rs4244285, rs12248560, rs776746, rs1799853, rs3212986 и rs1056836), ассоциированным с метаболизмом лекарственных средств в формировании противоопухолевого ответа на неоадъювантную (предоперационную) полихимиотерапию (НПХТ). В результате проведенного ассоциативного анализа между результатами молекулярно-генетических исследований и возрастом установления диагноза ТНРМЖ было показано, что имеются статистически значимые различия для rs241430 (*TAP2*), rs1008805 (*CYP19A1*) и rs4244285 (*CYP2C19*).

Ключевые слова: рак молочной железы, неоадъювантная химиотерапия, генетические маркеры, трижды негативный подтип.

Для цитирования: Молекулярно-генетический статус пациентов с трижды негативным раком молочной железы по результатам KASP-генотипирования / В. Н. Кипень А. О. Хоров, В. А. Лемеш [и др.] // Молекулярная и прикладная генетика: сб. науч. тр. / Ин-т генетики и цитологии НАН Беларуси; редкол.: А. В. Кильчевский (гл. ред.) [и др.]. – Минск, 2024. – Т. 37. – С. 71–81.

Введение

В 2020 г. Американское онкологическое общество (ACS, American Cancer Society) и Международное агентство по изучению рака (IARC, International Agency for Research on Cancer) опубликовали исследование под названием «Глобальная статистика рака 2020», согласно которому рак молочной железы (РМЖ) является самым диагностируемым среди злокачественных новообразований в мире и составил почти 12% от общего числа вновь выявленных случаев онкологии [1]. По данным белорусского канцер-регистра, РМЖ занимает первое место в структуре онкологической заболеваемости женского населения Беларуси. Отмечен прогрессивный рост заболеваемости РМЖ с 69,7 случаев на 100 000 человек в 2007 г. до 87,2 случаев на 100 000 человек в 2018 г. [2].

Около 40% пациентов с РМЖ при первичном обращении имеют местнораспространенный опухолевый процесс. Учитывая концепцию системности злокачественных опухолей, лечение таких пациентов необходимо начинать с неоадъювантной (предоперационной) химиотерапии (НАХТ), которая показана к использованию у женщин с местнораспространенным раком и позволяет уменьшить объем первичного очага и выполнить радикальное оперативное вмешательство. Ответ опухоли на лечение представляет собой комплекс индуцированных противоопухолевой терапией альтеративно-деструктивных изменений в новообразовании. Его оценка имеет особое зна-

чение для определения эффективности НАХТ. Предоперационная НАХТ может привести к уменьшению размеров первичных и вторичных опухолей, а также снижению инвазии опухоли вплоть до полной элиминации ее элементов, в том числе и в лимфатических узлах. Уменьшение размеров опухоли рассматривают в качестве признака ее химиочувствительности, а также как важный прогностический фактор, коррелирующий с выживаемостью онкологических пациентов. Эффективность проводимой системной терапии определяется степенью лечебного патоморфоза, которая представляет собой определенные патоморфологические изменения в опухоли под влиянием лекарственной терапии [3]. В настоящее время общепризнанной является система RCB (Residual Cancer Burden — «ложе остаточной опухоли»), при этом полному лекарственному патоморфозу соответствует нулевое значение индекса (RCB = 0) [4]. Повышение эффективности НАХТ может быть достигнуто посредством выявления новых молекулярно-генетических маркеров.

Потенциальными биомаркерами эффективности НАХТ выступают полиморфизмы в генах, влияющие на активность или на экспрессию мишени для лекарственного средства, на активность лекарственного средства/гормона, его метаболизм или транспорт. В настоящее время известно, что при РМЖ вследствие гиперметилирования может нарушаться экспрессия более чем 40 генов. Это могут быть гены клеточного цикла (*CDKN2A/pl6-INK4*, *CDKN2B/pl5-INK4B*, *CCND2*, *RBI*, *p14/ARF*, циклины D1 и D2), апоптоза (*TMSl*, *TP73*, *CDKN1*, *HOX5*, *MDM2*, *DAPK1*, *TWIST1*, *YTMS1*, *FHIT*, *RASSF1A*, *HIC-1*, *HIN-1*), репарации ДНК (*MGMT*, *BRCAl*, *MLH1*), метастазирования (*CDH1*, *CDH13*, *PCDH10*, *CTNB*), RAS- (*RASSF1*) и Wnt-сигнального пути (*APC*, *DKKL*), гормон- и рецептор- опосредованного сигналинга (*ESR1*, *PR*, *ER*, *RAR*, *NORE1*) и детоксикации ксенобиотиков (*GSTP1*) [5–7].

В качестве потенциальных биомаркеров эффективности НАХТ могут выступать полиморфизмы в генах, влияющие на активность или на экспрессию мишени для лекарственного средства (ароматазы, *CYP19A1*), на активность лекарственного средства/гормона (*CYP17A1*, *ESR1*, *ESR2*, *PRDM2*), его метаболизм (*COMT*, *CYP1B1*, *UDP*, *UGT1A1*, *CYP3A4*, *CYP3A5*) или транспорт (*ABC*, *SLCO*) и др. [8–9].

В связи с этим проведение неоадъювантной полихимиотерапии (НПХТ) становится одним из приоритетных направлений в лечении РМЖ, особенно при трижды негативном подтипе — ТНРМЖ. Это объясняет продолжающийся поиск более эффективных режимов химиотерапии, назначение которых будет базироваться на детальном генетическом статусе пациента [10]. Таким образом, изучение молекулярной природы опухолевых клеток является принципиально важным вопросом и может помочь в определении различных подтипов данной патологии, что, в свою очередь, может спрогнозировать поведение и тактику лечения опухолей.

Целью исследования является характеристика молекулярно-генетического статуса пациентов с ТНРМЖ по генам семейства цитохрома Р450 (CYP), переносчиков АТФ-связывающих кассет (ABS), репарационных систем, контроля клеточного цикла и др.

Материалы и методы

Характеристика группы исследования. Молекулярно-генетические исследования выполнены на базе лаборатории прикладной геномики ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси». Сбор образцов венозной крови пациентов, выяснение индивидуального и семейного анамнеза осуществлялись в РНПЦ радиологии и онкологии им. Н. Н. Александрова сотрудниками учреждения. В выборку для исследований были включены 90 пациентов с клинически верифицированным диагнозом ТНРМЖ. Возрастная медиана для пациентов составила 48,11 года (25-й процентиль — 39,41 года, 75-й процентиль — 58,12 года, возрастной диапазон — [25,65–77,97] года).

Сбор биологического материала и анкетных данных проводился с соблюдением всех этических норм после подписания опрашиваемыми пациентами формы информированного согласия. Дизайн исследования был одобрен биоэтическим комитетом ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси».

Клинико-инструментальные и лабораторные исследования. Во всех случаях было проведено иммуногистохимическое исследование

опухоли, полученной при трепан-биопсии (до проведения системной терапии), на основании результатов которой и был определен молекулярно-генетический подтип опухоли — ТНРМЖ. Всем пациентам, включенным в исследование, проведено от одного до восьми курсов НПХТ. После каждых двух курсов НПХТ оценивался непосредственный противоопухолевый эффект по критериям оценки ответа солидных опухолей RECIST (Response evaluation criteria in solid tumours) [11]. После завершения курсов НПХТ пациентам проводился хирургический этап специального лечения, затем оценивались противоопухолевый и патоморфологический эффекты НПХТ по системе RCB (Residual Cancer Burden — «ложе остаточной опухоли»).

Выделение ДНК и молекулярно-генетический анализ. Венозная кровь отбиралась в пробирки с цитратом натрия 3,8% Citrate (9NC 0,129M) IMPROVE. Для выделения ДНК из лейкоцитов отбирали аликвоту в 100 мкл, остаток хранили при –20 °C. ДНК из образцов крови выделялась при помощи наборов «Арт ДНК MiniSpin Эксперт» (ООО «АртБиоТех», Беларусь) согласно инструкции производителя. Концентрацию ДНК и степень ее очистки определяли с использованием спектрофотометра Implen Nano Photometer N50 (Implen, Германия). Для оценки нативности ДНК дополнительно проводили электрофоретическое разделение препаратов ДНК в 1,0%-ом агарозном геле (1X ATE-буфер, 100V, 60 мин). Далее концентрация ДНК для всех образцов была стандартизирована до 20 нг/мкл.

На основании проведенного аналитического обзора научной литературы для молекулярно-генетического анализа ДНК пациентов с ТНРМЖ был сформирован следующий перечень однонуклеотидных полиморфизмов (SNP, Single Nucleotide Polymorphism) — таблица 1.

Для генотипирования была использована технология, основанная на конкурентной аллель-специфической ПЦР (KASP, kompetitive allele specific PCR, LGC Biosearch Technologies). Генотипирование проводилось с использованием KASP Assay mix (KASP by Design, KBD) и KASP Master mix согласно рекомендациям LGC Biosearch Technologies. Дизайн протокола (подбор праймеров) выполнялся компанией LGC Biosearch Technologies при помощи программного обеспечения

Таблица 1

Исследуемые полиморфные варианты

Ген	SNP	GRCh38.p14	Ген	SNP	GRCh38.p14
–	rs6896596	5:135442780	*CYP3A4*	rs2740574	7:99784473
ABCB1	rs2235035	7:87549770	*CYP3A5*	rs776746	7:99672916
ABCC1	rs17205838	16:16046184	*ERCC1*	rs11615	19:45420395
ABCC1	rs35596	16:16059083	*ERCC1*	rs3212986	19:45409478
ABCC2	rs4919395	10:99783206	*ERCC2*	rs13181	19:45351661
ABCG2	rs2231137	4:88139962	*GSTP1*	rs1695	11:67585218
ATM	rs1801516	11:108304735	*MDM2*	rs2279744	12:68808800
COMT	rs4680	22:19963748	*SLC25A21*	rs1154121	14:36880263
CYP19A1	rs1008805	15:51257402	*TAP2*	rs241429	6:32836063
CYP1B1	rs1056836	2:38071060	*TAP2*	rs241430	6:32835043
CYP2C19	rs12248560	10:94761900	*TP53*	rs1042522	17:7676154
CYP2C19	rs4244285	10:94781859	*XRCC1*	rs25487	19:43551574
CYP2C9	rs1799853	10:94942290	*XRCC3*	rs861539	14:103699416

Kraken™ и валидировался методом *in silico*. Протоколы проведения KASP-генотипирования разработаны и утверждены на ученом совете ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси». В качестве примера результаты аллельной дискриминации (в виде 2D-plot) для SNP rs1695 (*GSTP1*) приведены на рисунке 1.

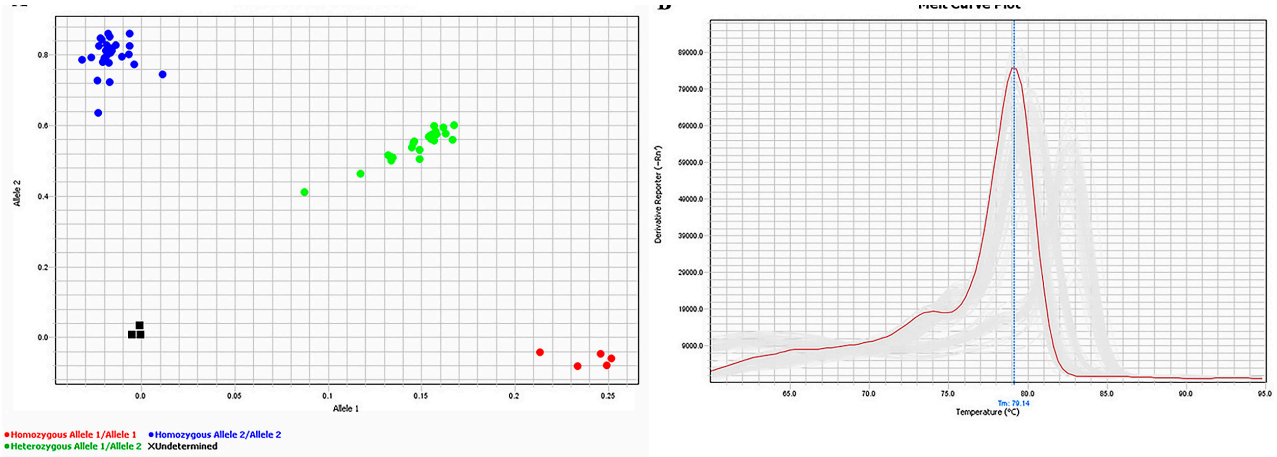

Рис. 1. А — 2D-plot аллельной дискриминации; Б — кривая плавления для ампликона

MDR-анализ. Анализ межгенных взаимодействий проводился биоинформатическим методом многофакторного сокращения размерности (Multifactor Dimensionality Reduction, MDR) с использованием размещенной в открытом доступе программы MDR v.3.0.2. В процессе моделирования были использованы высококонсервативные настройки поиска конфигурации модели, которые позволили однозначно дифференцировать наличие/отсутствие статистически значимых эффектов. Математической базой данной программы является непараметрический кластерный анализ для обнаружения и описания нелинейного типа взаимодействия между дискретными генетическими атрибутами и анализируемыми факторами.

Статистический анализ. Статистический анализ проводился с использованием программ Microsoft Excel (Microsoft Corporation, США) и SPSS v.20.0 (IBM, США). Количественные данные представлены как среднее ± стандартное отклонение (x ± SD). Для сравнения количественных данных после проверки на гомоскедастичность (тест Левена, Levene test) и нормальность распределения (критерий согласия Колмогорова) использовали метод дисперсионного анализа — ANOVA (ANalysis Of VAriance). В случае обнаружения статистически значимых различий при проверке на гомоскедастичность и нормальность распределения использовали непараметрический критерий Краскела-Уоллеса.

Результаты исследования

Результаты молекулярно-генетического тестирования выборки пациентов с ТНРМЖ по исследуемым полиморфизмам генов *ABCB1*, *ABCC1*, *ABCC2*, *ABCG2*, *ATM*, *COMT*, *CYP19A1*, *CYP1B1*, *CYP2C19*, *CYP2C9*, *CYP3A4*, *CYP3A5*, *ERCC1*, *ERCC2*, *GSTP1*, *MDM2*, *SLC25A21*, *TAP2*, *TP53*, *XRCC1* и *XRCC3* представлены в таблице 2.

В итоге проведенного ассоциативного анали-

Таблица 2

Результаты молекулярно-генетического тестирования (частоты в %)

SNP	Аллель A	Аллель B	AA	AB	BB	SNP	Аллель A	Аллель B	AA	AB	BB
rs6896596	A	G	55,6	33,3	11,1	rs2740574	C	T	–	6,7	93,3
rs2235035	A	G	12,2	46,7	41,1	rs776746	C	T	84,4	14,5	1,1

Окончание таблицы 2

SNP	Аллель A	Аллель B	AA	AB	BB	SNP	Аллель A	Аллель B	AA	AB	BB
rs17205838	C	G	3,3	28,9	67,8	rs11615	A	G	37,8	48,9	13,3
rs35596	C	T	4,4	20,0	75,6	rs3212986	A	C	5,6	41,1	53,3
rs4919395	A	G	17,8	45,5	36,7	rs13181	T	G	32,2	47,8	20,0
rs2231137	C	T	91,1	8,9	–	rs1695	A	G	50,0	45,6	4,4
rs1801516	A	G	3,4	23,3	73,3	rs2279744	T	G	42,2	48,9	8,9
rs4680	A	G	31,1	51,1	17,8	rs1154121	C	T	43,3	50,0	6,7
rs1008805	A	G	46,7	32,2	21,1	rs241429	A	G	10,0	40,0	50,0
rs1056836	C	G	13,3	47,8	38,9	rs241430	C	T	45,5	36,7	17,8
rs12248560	C	T	48,9	41,1	10,0	rs1042522	C	G	47,8	40,0	12,2
rs4244285	A	G	5,6	22,2	72,2	rs25487	C	T	45,6	37,8	16,6
rs1799853	C	T	78,9	21,1	–	rs861539	A	G	14,5	43,3	42,2

за между результатами молекулярно-генетических исследований и возрастом установления диагноза ТНРМЖ было показано, что имеются статистически значимые различия (табл. 3).

Определено, что среди пациентов с генотипом CT/TT (т. е. при наличии аллеля T) по полиморфизму rs241430 (*TAP2*) значение среднего возраста установления диагноза оказалось ниже в среднем на 7,67 года, чем среди пациентов с альтернативным генотипом CC. Частота распространенности аллеля T в исследуемой выборке пациентов составила 36,11%.

Также при наличии аллеля A (генотипы AG/AA) по полиморфизму rs1008805 (*CYP19A1*) значение среднего возраста установления диагноза оказалось ниже в среднем на 7,04 го-

Таблица 3

Результаты ассоциативного анализа между возрастом установления диагноза и данными молекулярно-генетических исследований

SNP (ген)	Генотип	Среднее значение	Стандартное отклонение	Значение F	p (для F)	p (тест Левена)
rs241430 (*TAP2*)	**CC** **CT** **TT**	**53,09** **45,90** **44,42**	**11,99** **10,87** **10,96**	**5,136**	**0,008**	**0,450**
	CC **CT/TT**	**53,09** **45,42**	**11,99** **10,81**	**10,185**	**0,002**	**0,201**
	TT CT/CC	44,42 49,89	10,96 11,98	2,818	0,097	0,509
rs1008805 (*CYP19A1*)	AA AG GG	47,48 47,34 54,47	11,77 12,17 10,81	2,710	0,072	0,646
	AA AG/GG	47,48 50,16	11,77 12,06	1,131	0,291	0,439
	GG **AG/AA**	**54,47** **47,43**	**10,81** **11,85**	**5,480**	**0,021**	**0,612**

Окончание таблицы 3

SNP (ген)	Генотип	Среднее значение	Стандартное отклонение	Значение F	p (для F)	p (тест Левена)
rs4244285 (*CYP2C19*)	AA AG GG	47,92 43,77 50,57	15,60 10,32 11,83	2,598	0,080	0,669
	AA AG/GG	47,92 48,97	15,60 11,80	0,036	0,849	0,785
	GG **AG/AA**	**50,57** **44,60**	**11,83** **11,30**	**4,720**	**0,031**	**0,603**

да, чем среди пациентов с альтернативным генотипом GG. Частота распространенности аллеля A в исследуемой выборке пациентов составила 62,78%.

При наличии аллеля A (генотипы AG/AA) по полиморфизму rs4244285 (*CYP2C19*) значение среднего возраста установления диагноза оказалось ниже в среднем на 5,97 года, чем среди пациентов с альтернативным генотипом GG. Частота распространенности аллеля A в исследуемой выборке пациентов составила 16,67%.

Дополнительный статистический анализ, направленный на оценку наличия ассоциаций между результатами генотипирования с такими параметрами, как гистологическая форма (мультицентрическая или уницентрическая), гистологический тип (инвазивный протоковый или другие типы), степень злокачественности опухоли (G), не выявил статистически значимых различий. Только для полиморфизма rs1008805 (*CYP19A1*) было показано, что среди пациентов с ТНРМЖ при наличии аллеля G количество случаев инвазивного протокового рака отмечено в 1,33 раза больше, чем при наличии генотипа AA (табл. 4).

Проведено моделирование взаимодействия исследуемых полиморфных вариантов генов в зависимости от возраста установления диагноза. Дерево кластеризации и граф межгенных взаимодействий представлены на рисунке 2. В результате моделирования сформировано три больших кластера:

«Кластер 1» — rs35596, rs861539, rs11615, rs1056836, rs1008805, rs4244285, rs13181, rs2235035, rs25487, rs2231137, rs3212986;

«Кластер 2» — rs2740574, rs241430, rs241429, rs4919395;

«Кластер 3» — rs1799853, rs1695, rs1042522, rs1154121, rs776746, rs6896596, rs17205838, rs4680, rs1801516, rs2279744, rs12248560.

Анализ дерева кластеризации позволил сделать следующие заключения:

– для взаимодействия полиморфных вариантов rs11615/rs1056836 характерен вы-

Таблица 4

Результаты ассоциативного анализа между генотипом по rs1008805 (*CYP19A1*) и гистологическим типом опухоли

SNP (ген)	Генотип	Частота встречаемости, % (абсолютное значение)		p
		Другие типы	Инвазивный протоковый	
rs1008805 (*CYP19A1*)	AA	40,5 (17)	59,5 (25)	0,121
	AG	24,1 (7)	75,9 (22)	
	GG	15,8 (3)	84,2 (16)	
	AA	**40,5 (17)**	**59,5 (25)**	**0,042**
	AG/GG	**20,8 (10)**	**79,2 (38)**	
	GG	15,8 (3)	84,2 (16)	0,165
	AG/AA	33,8 (24)	66,2 (47)	

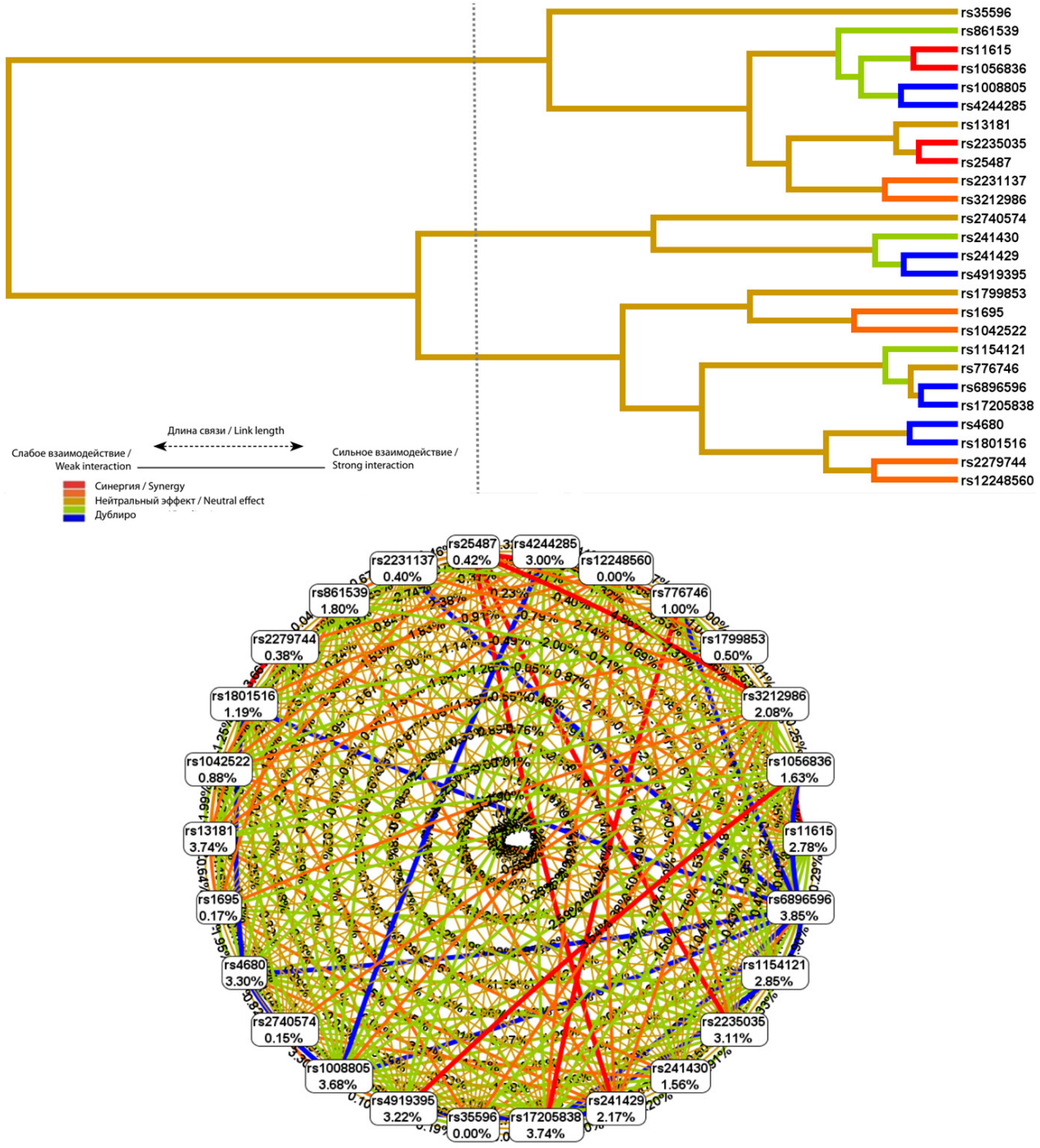

Рис. 2. Дендрограмма и граф межгенных взаимодействий в изменение переменной «Возраст»

раженный синергический эффект — +4,64% энтропии (линия красного цвета), rs2235035/rs25487 — +5,31% энтропии;

– для взаимодействия полиморфных вариантов rs2231137/rs3212986 характерен умеренно выраженный синергический эффект — +2,74% энтропии (линия оранжевого цвета), rs1695/rs1042522 — +1,90% энтропии, rs2279744/rs12248560 — +2,38% энтропии;

– для взаимодействия полиморфных вариантов rs1008805/rs4244285, rs241429/rs4919395, rs6896596/rs17205838, rs4680/rs1801516 характерен дублирующий эффект (линия синего цвета), т. к. данные переменные высокоскоррелированы;

– все остальные взаимодействия имеют сла-

бо выраженный дублирующий эффект или нейтральны.

Наиболее значимый вклад в изменение переменной «Возраст» был отмечен для rs6896596; rs13181; rs17205838; rs1008805; rs4680; rs4919395; rs2235035 и rs4244285 — значение энтропии составило 3,85; 3,74; 3,74; 3,68; 3,30; 3,22; 3,11 и 3,00% соответственно. Для rs241430, rs1008805 и rs4244285, для которых по результатам ассоциативного анализа были выявлены статистически значимые различия (табл. 3), совокупный вклад в изменение переменной «Возраст» составил 11,23% энтропии.

ТНРМЖ — наиболее изучаемый подтип РМЖ в последние годы. Это связано с тем, что данный подтип отличается агрессивностью клинического течения и выраженной молекулярной гетерогенностью в пределах одного фенотипа. По данным литературы, выделяют семь подтипов ТНРМЖ [12]. Молекулярно-генетический анализ показывает, что около 70% опухолей молочных желез с трижды негативным фенотипом являются истинно базальноподобными, остальные 30% — другие биологически различные молекулярные подтипы. ТНРМЖ, базальноподобный по гистологическому строению, в большинстве случаев является низкодифференцированным протоковым раком. Эта классификация показывает существующую геномную, молекулярную и биологическую характеристику ТНРМЖ, которая необходима для определения терапевтических точек приложения и подбора наиболее эффективных схем лечения [13]. ТНРМЖ является наиболее устойчивым к терапии. На сегодняшний день, в связи с увеличением частоты встречаемости данного типа рака у молодых женщин репродуктивного возраста, существует острая необходимость в улучшении методов лечения этой формы заболевания. Системная терапия является одним из важнейших этапов комплексного лечения ТНРМЖ. Терапия пациентов с ТНРМЖ основана на применении плотнодозных схем химиотерапии с использованием цитотоксических препаратов. Основной целью НПХТ при ТНРМЖ является достижение полной морфологической регрессии. Вопрос наиболее оптимальной схемы НПХТ при ТНРМЖ остается открытым. По данным литературы, в лечении данного подтипа опухоли распространено использование комбинации антрациклинов и таксанов, в этом плане показательным является исследование GEPARTRIO [14].

В настоящее время множественную лекарственную устойчивость (МЛУ) опухолевых клеток к химиотерапевтическим препаратам считают одной из наиболее важных причин неэффективности терапии злокачественных новообразований. Молекулярные механизмы МЛУ связаны с гиперэкспрессией в опухолевых клетках генов семейства ABC (ATP-Binding Cassette transporter), продукты которых функционируют как энергозависимый насос и осуществляют выброс цитостатических препаратов из клетки против градиента концентрации [15]. В исследовании М. М. Цыганова с соавторами (2017) было выявлено восемь однонуклеотидных полиморфизмов, оказывающих влияние на экспрессию генов ABC, два из них (rs241430 и rs241429) оказывали значимое влияние на послеоперационный уровень экспрессии гена *TAP2* в опухолевой ткани молочной железы [16]. Для гена *TAP2* (NCBI Gene ID 6891) при наличии у пациента мутантного генотипа TT по rs241430 уровень экспрессии был статистически значимо ниже, чем при генотипе дикого типа CC. Оба полиморфизма (rs241430 и rs241429) выполняют функцию транскрипционных регуляторов и могут оказывать существенное влияние на экспрессию собственного гена.

Полученные нами данные свидетельствуют о том, что именно при наличии мутантного аллеля T по полиморфизму rs241430 (*TAP2*) значение среднего возраста установления диагноза оказалось ниже в среднем на 7,67 года, чем среди пациентов с альтернативным генотипом CC (табл. 3). Возможно, значительно сниженный уровень экспрессии гена *TAP2* приводит к таким последствиям.

В исследовании Shao X. с соавторами (2017) было показано, что однонуклеотидный полиморфизм в гене *CYP19A1* может изменить активность ароматазы и уровни циркулирующих стероидных гормонов у женщин. Наличие генотипа GG по rs1008805 было связано с худшим клиническим результатом гормональной терапии у женщин в постменопаузе и ранним РМЖ [17]. Также ранее было установлено, что наличие хотя бы одного аллеля G по rs1008805 было статистически значимо ассоциировано

с увеличением риска РМЖ (ОШ = 1,72 [95% ДИ, 1,20–2,49]), особенно при отрицательном по рецепторам эстрогена и прогестерона ОШ = 3,89 [95% ДИ, 1,74–8,70] и ОШ = 2,52 [95% ДИ, 1,26–5,05] соответственно [18].

В проведенном нами исследовании показано, что при наличии аллеля А (генотипы AG/AA) по полиморфизму rs1008805 (*CYP19A1*) значение среднего возраста установления диагноза оказалось ниже в среднем на 7,04 года, чем среди пациентов с альтернативным генотипом GG. Таким образом, для ТНРМЖ без гормональной терапии показан вклад в раннее развитие заболевания именно мажорного аллеля А. Для мутантного аллеля G нами выявлена ассоциация с инвазивным протоковым ТНРМЖ, случаи которого в исследованной выборке отмечались в 1,33 раза чаще, чем при наличии генотипа АА (табл. 4).

Полиморфизм rs4244285 представляет собой SNP в гене *CYP2C19*, кодирующий вариант CYP2C19*2. Данный полиморфизм является наиболее распространенной причиной изменения уровня метаболизма таких соединений, как мефенитоин (противосудорожное средство), некоторых антидепрессантов, антитромбоцитарного препарата Плавикс, некоторых лекарств, используемых при язвенных состояниях различного генеза и прочее [19]. Предполагается, что для пациентов со сниженным метаболизмом многих цитохромов p450 достигается более высокий терапевтический успех для ряда лекарств по причине того, что некоторые вещества расщепляются (т. е. метаболизируются) медленнее, как итог — эффективные концентрации выше и действуют они дольше [20]. В исследовании Lim с соавторами было оценено влияние полиморфизмов генов *CYP2D6*, *CYP3A5*, *CYP2C9* и *CYP2C19* на фармакокинетику тамоксифена у пациентов с РМЖ [21]. Было показано, что генотипы CYP2D6*5/*10 и *10/*10 связаны со значительно более низкими концентрациями активного метаболита тамоксифена и эндоксифена, а роль полиморфизма генов *CYP3A5*, *CYP2C9* и *CYP2C19* оценивалась как незначительная.

Результаты наших исследований свидетельствуют, что при наличии мутантного аллеля А (генотипы AG/AA) по полиморфизму rs4244285 (*CYP2C19*) значение среднего возраста установления диагноза оказалось ниже в среднем на 5,97 года, чем среди пациентов с альтернативным генотипом GG. С учетом вклада данного полиморфизма в фармакокинетику широкого перечня лекарственных веществ, остается открытым вопрос о роли данного SNP в увеличение риска развития ТНРМЖ.

Заключение

Таким образом, межиндивидуальные особенности в предрасположенности к РМЖ, включая его трижды негативный тип, коррелируют с генетическими различиями, вызванными полиморфизмом. Генетические вариации ферментов, метаболизирующих лекарственные вещества или инактивирующие их, могут отрицательно или положительно влиять на фармакокинетический профиль химиотерапевтических агентов, что в конечном итоге приводит к фармакокинетической резистентности и токсичности в отношении противораковых препаратов.

Определенные нами частоты распространенности 26 SNP в 21 гене семейства цитохрома P450 (CYP), переносчиков АТФ-связывающих кассет (ABS), репарационных систем, контроля клеточного цикла и сигнальных путей положили начало для исследования вклада данных полиморфизмов в генез, развитие ТНРМЖ, а также оценку противоопухолевого и патоморфологического эффекта используемых схем НПХТ при лечении пациентов в Республике Беларусь.

Значимость выявленных ассоциаций с возрастом установления диагноза для ряда генотипов по клинически значимым SNP, включенным в данное исследование, остается до конца не определенной и требует дальнейшего научного поиска.

Список использованных источников

1. ALL CANCERS [Электронный ресурс]. – Режим доступа: https://gco.iarc.who.int/media/globocan/factsheets/cancers/39-all-cancers-fact-sheet.pdf. – Дата доступа: 21.08.2024.

2. Рак в Беларуси: цифры и факты. Анализ данных Белорусского канцеррегистра за 2010–2019 гг. / Океанов А. Е. [и др.] // Минск: РНПЦ ОМР им. Н. Н. Александрова. – 2020. – 298 с.

3. Роль и критерии оценки морфологического регресса рака молочной железы после

неоадъювантной терапии / Г. А. Франк [и др.] // Современная онкология. – 2015. – Т. 17, № 2. – С. 30–34.

4. Recommendations for standardized pathological characterization of residual disease for neoadjuvant clinical trials of breast cancer by the BIG-NABCG collaboration / V. Bossuyt [et al.] // Ann. Oncol. – 2015. – Vol. 26, № 7. – P. 1 280–1 291.

5. Promoter hypermethylation of the tumor-suppressor genes *RASSF1A*, *GSTP1* and *CDH1* in endometrial cancer / R. Fiolka [et al.] // Oncol. Rep. – 2013. – Vol. 30, № 6. – P. 2 878–2 886.

6. DNA methylation and miRNAs regulation in hereditary breast cancer: epigenetic changes, players in transcriptional and post- transcriptional regulation in hereditary breast cancer / R. Pinto [et al.] // Curr. Mol. Med. – 2014. – Vol. 14, № 1. – P. 45–57.

7. The Role of Methylation in Breast Cancer Susceptibility and Treatment / M. Pouliot [et al.] // Anticancer Res. – 2015. – Vol. 35, № 9. – P. 4 569–4 574.

8. Nakanishi, T. Drug transporters as targets for cancer chemotherapy / T. Nakanishi // Cancer Genomics Proteomics. – 2007. – Vol. 4, № 3. – P. 241–254.

9. Taheri, M. Effect of MDR1 polymorphism on multidrug resistance expression in breast cancer patients / M. Taheri, F. Mahjoubi, R. Omranipour // Genet. Mol. Res. – 2010. – Vol. 12, № 9 (1). – P. 34–40.

10. Степина, М. Б. Рак молочной железы: наиболее важные научные события и выводы последних лет / М. Б. Степина, М. А. Фролова // Практическая онкология. – 2011. – Т. 12. – С. 6–11.

11. New response evaluation criteria in solid tumours: Revised RECIST guideline (version 1.1) / E. A. Eisenhauer [et al.] // Eur. J. Cancer. – 2009. – Vol. 45, № 2. – P. 228–247.

12. Intrinsic resistance of tumorigenic breast cancer cells to chemotherapy / Li X. [et al.] // J. Natl. Cancer Inst. – 2008. – Vol. 7, № 100 (9). – P. 672–679.

13. Поддубная И. В. Клиническая характеристика тройного негативного рака молочной железы / И. В. Поддубная, Д. А. Карселадзе // Вестник РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН. – 2010. – Т. 21, № 1 (79). – С.71–76.

14. *In vivo* chemosensitivity-adapted preoperative chemotherapy in patients with early-stage breast cancer: the GEPARTRIO pilot study / G. von Minckwitz [et al.] // Ann. Oncol. – 2005. Vol. 16, № 1. – P. 56–63.

15. Wind, N. S. Multidrug resistance in breast cancer: from in vitro models to clinical studies / N. S. Wind, I. Holen // Int. J. Breast Cancer. – 2011. – Vol. 2011:967419. – P. 1–12.

16. Исследование однонуклеотидных полиморфизмов генов ABC-транспортеров в опухоли молочной железы: связь с экспрессией / М. М. Цыганов [и др.] // Исследование. Медицинская генетика. – 2017. – Т. 16, № 1. – С. 25–30.

17. Rs1008805 polymorphism of *CYP19A1* gene is associated with the efficacy of hormone therapy in stage I–II and operable stage III breast cancer / X. Shao [и др.] // Oncol. Lett. – 2017. – P. 6 156–6 162.

18. A CYP19 (aromatase) polymorphism is associated with increased premenopausal breast cancer risk / K. E. Talbott [et al.] // Breast Cancer Res. Treat. – 2008. – Vol. 111, № 3. – P. 481–487.

19. The major genetic defect responsible for the polymorphism of S-mephenytoin metabolism in humans / S. M. de Morais [и др.] // J. Biol. Chem. – 1994. – Vol. 269, № 22. – P. 15 419–15 422.

20. Furuta, T. Effect of genetic differences in omeprazole metabolism on cure rates for *Helicobacter pylori* infection and peptic ulcer / T. Furuta // Ann. Intern. Med. – 1998. – Vol. 129, № 12. – P. 1 027–1 030.

21. Impact of *CYP2D6*, *CYP3A5*, *CYP2C9* and *CYP2C19* polymorphisms on tamoxifen pharmacokinetics in Asian breast cancer patients / J. S. L. Lim [et al.] // Br. J. Clin. Pharmacol. – 2011. – Vol. 71, № 5. – P. 737–750.

V. N. Kipen[1], A. O. Khorau[2], V. A. Lemesh[1], E. I. Hodoronok[2], A. A. Burakova[1], O. I. Dobysh[1]

MOLECULAR GENETIC STATUS OF PATIENTS WITH TRIPLE-NEGATIVE BREAST CANCER ACCORDING TO KASP GENOTYPING RESULTS

[1]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
[2]N. N. Alexandrov National Cancer Centre of Belarus
223040 Lesnoy agro-town, Minsk District, the Republic of Belarus

Molecular genetic studies were conducted for 90 patients with a clinically verified diagnosis of TNBC (triple-negative breast cancer). The frequencies of minor alleles were determined by 26 polymorphisms (rs11615, rs6896596, rs1154121, rs2235035, rs241430, rs241429, rs17205838, rs35596, rs4919395, rs1008805, rs2740574, rs4680, rs1695, rs13181, rs1042522, rs1801516, rs2279744, rs861539, rs2231137, rs25487, rs4244285, rs12248560, rs776746, rs1799853, rs3212986 and rs1056836) associated with drug metabolism in the formation of an antitumor response to neoadjuvant (preoperative) chemotherapy (NPCT). The association analysis showed that there are statistically significant differences for rs241430 (*TAP2*), rs1008805 (*CYP19A1*) and rs4244285 (*CYP2C19*) based on molecular genetic study results and the age of diagnosed TNBC.

Keywords: breast cancer, neoadjuvant chemotherapy, genetic markers, triple-negative subtype.

Дата поступления в редакцию: 02 сентября 2024 г.

УДК 579.25

О. В. Евдокимова, А. А. Муратова, А. Э. Охремчук, М. А. Сиколенко, Л. Н. Валентович

АНАЛИЗ ГЕНОМОВ МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ, ПЕРСПЕКТИВНЫХ ДЛЯ СОЗДАНИЯ СИСТЕМ ЭКСПРЕССИИ ГЕТЕРОЛОГИЧНЫХ ГЕНОВ

Государственное научное учреждение
«Институт микробиологии Национальной академии наук Беларуси»
Республика Беларусь, 220084, г. Минск, ул. Акад. Купревича, 2
e-mail: evdokimovalesia@gmail.com

Выполнено секвенирование и сборка *de novo* геномов бактерий *Lacticaseibacillus rhamnosus* БИМ В-189, *Lactococcus lactis* БИМ В-1834 и *Lactococcus cremoris* NZ3900 — потенциальных реципиентов векторов для экспрессии гетерологичных генов. Анализ геномов *in silico* подтвердил безопасность штаммов: показал отсутствие генов токсинов, факторов вирулентности и детерминант, ассоциированных с переносом устойчивости к антибиотикам. Для всех штаммов предсказаны кластеры синтеза вторичных метаболитов, в том числе бактериоцинов. Анализ мобильных генетических элементов выявил нестабильность генома бактерий *Lc. rhamnosus* БИМ В-189. У бактерий *L. lactis* БИМ В-1834 обнаружены три низкокопийные плазмиды, одна из которых содержит детерминанты конъюгативного переноса. Обсуждается возможность использования штаммов для создания систем экспрессии гетерологичных генов.

Ключевые слова: *Lactococcus lactis*, *Lactococcus cremoris*, *Lacticaseibacillus rhamnosus*, полногеномное секвенирование, аннотация генома.

Для цитирования: Анализ геномов молочнокислых бактерий, перспективных для создания систем экспрессии гетерологичных генов / О. В. Евдокимова, А. А. Муратова, А. Э. Охремчук [и др.] // Молекулярная и прикладная генетика: сб. науч. тр. / Ин-т генетики и цитологии НАН Беларуси; редкол.: А. В. Кильчевский (гл. ред.) [и др.]. – Минск, 2024. – Т. 37. – С. 82–94.

Введение

Молочнокислые бактерии (МКБ) — это обширная несистематическая группа, объединяющая представителей родов *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* и др., которые имеют статус безопасных микроорганизмов (GRAS — generally recognized as safe), подтвержденный длительным использованием для получения кисломолочных, ферментированных растительных и мясных продуктов [1]. Статус безопасности определяет перспективность применения МКБ для производства и доставки биоактивных молекул в организм человека или животных. Одним из успешно реализуемых направлений использования МКБ является применение отдельных штаммов в качестве пробиотиков — живых микроорганизмов, которые при приеме в достаточном количестве приносят пользу здоровью хозяина [2]. В альтернативном подходе используются МКБ для синтеза и/или доставки гетерологичных биоактивных молекул [3–5], что связано с созданием генно-инженерных штаммов. Благодаря развитию и внедрению методов модификации генома, биоинженерные МКБ, и особенно пробиотические штаммы, могут стать терапевтическими системами следующего поколения [6].

Для любого микроорганизма, планируемого для применения в биотехнологической промышленности, важным критерием отбора является безопасность. До недавнего времени основными методами оценки безопасности штамма являлись эмпирические тесты на основе фенотипического проявления признаков и исследование токсикологических воздействий на животных. Развитие методов полногеномного секвенирования и использование биоинформатического анализа позволяет выявлять наличие в геноме потенциальных генов,

кодирующих устойчивость к антибиотикам, патогенность и другие угрожающие здоровью факторы [7]. Анализ полного генома дает возможность выявить гены определенных метаболических путей, присутствие генетических детерминант устойчивости к стрессовым факторам и на основе этих данных предсказывать ферментативные возможности штамма и его пробиотический потенциал [8]. По наличию в пределах генома активных мобильных генетических элементов, таких как транспозоны, IS-элементы и профаги, можно судить о стабильности генома, а по присутствию компонентов систем рестрикции-модификации (P-M), CRISPR-Cas и других специализированных «антифаговых» систем — о защите от чужеродной ДНК [9]. Большинство систем экспрессии гетерологичных генов реализовано на основе коммерческих штаммов *Lactococcus lactis* и ограниченное количество — на основе *Lactobacillus* spp. Поэтому актуальным является поиск новых штаммов для разработки и усовершенствования систем экспрессии в МКБ [10, 11].

Ранее нами были отобраны коллекционные штаммы МКБ *L. lactis* БИМ B-1834 и *Lacticaseibacillus rhamnosus* БИМ B-189 как перспективные микроорганизмы для экспрессии гетерологичных генов, наряду с коммерческим штаммом *L. lactis* NZ3900, на основании ряда параметров: способности к трансформации, чувствительности к антибиотикам, гены устойчивости к которым используются в качестве селективных маркеров в векторных конструкциях, и отсутствию природных плазмид (данные в печати). Бактерии *L. lactis* БИМ B-1834 были выделены в 2022 г. из закваски для приготовления кисломолочных продуктов сотрудниками ГНУ «Институт микробиологии НАН Беларуси». Видовая принадлежность была установлена на основании сходства последовательностей генов 16S рРНК, секвенирование других локусов генома не осуществлялось. Штамм *Lc. rhamnosus* БИМ B-189, полученный из Всероссийской коллекции микроорганизмов (VKM B-574), является типовым штаммом вида и находится во многих коллекциях микроорганизмов под номерами DSM 20021, NBRC 3425, NRRL B-442, NCTC 13764 и др. На момент секвенирования в базе данных GenBank было депонировано четыре последовательности генома данного штамма (под номерами соответствующих коллекций), собранные до контигов или скаффолда. В публикациях представлено только короткое сообщение, анонсирующее секвенирование генома штамма *Lc. rhamnosus* NRRL B-442 [12], детального анализа генома этого штамма не удалось найти. В предшествующей работе по подбору штаммов нам не удалось выделить плазмидную ДНК из бактерий *Lc. rhamnosus* БИМ B-189, выросших после трансформации плазмидой pLF14, при этом введение ее в клетки подтверждалось методом ПЦР (данные в печати). Поэтому для полногеномного секвенирования использовали трансформантов бактерий *Lc. rhamnosus* БИМ B-189, чтобы дополнительно установить копийность плазмиды pLF14 в клетках данных бактерий. Штамм *L. lactis* NZ3900 является компонентом коммерческой системы экспрессии генов под контролем низина (NICE®) [13]. В базе данных GenBank имеется последовательность генома *Lactococcus cremoris* MG1363 — предшественника всех генно-инженерных штаммов, сконструированных для системы NICE®, последовательность штамма NZ3900 отсутствует.

Целью настоящей работы являлось секвенирование и анализ геномов бактерий *Lc. rhamnosus* БИМ B-189, *L. lactis* NZ3900 и *L. lactis* БИМ B-1834 и последующая оценка перспективности их использования в качестве штаммов для эффективной экспрессии гетерологичных генов.

Материалы и методы

Бактерии рода *Lactococcus* выращивали в жидкой или на агаризованной среде M17 (Himedia, M1029) с добавлением глюкозы 0,5% при температуре 30 °C, бактерии *Lc. rhamnosus* БИМ B-189 — в жидкой или на агаризованной среде MRS (Himedia, GM641) при 37 °C в условиях анаэробиоза или микроаэробиоза.

Тотальную ДНК для полногеномного секвенирования выделяли из одной изолированной колонии с помощью набора «Bacteria DNA Preparation – Solution Kit» (Jena Bioscience, PP-206). Секвенирование на платформе MiSeq (Illumina, США) проводили с использованием комплекта реактивов

«MiSeq Reagent Kit v3» (Illumina, MS-102-3003, США); приготовление библиотек фрагментов ДНК осуществляли с использованием набора «NEBNext Ultra II FS DNA Library Prep Kit for Illumina» (New England Biolabs, E7805, США) согласно инструкции производителя. Секвенирование на платформе MinION (Oxford Nanopore Technologies, Великобритания) проводили с использованием ячейки R9.4.1 или R10.4.1 (Oxford Nanopore Technologies, Великобритания, FLO-MIN106 или FLO-MIN114); приготовление библиотек фрагментов ДНК осуществляли с использованием набора «Ligation Sequencing Kit» (Oxford Nanopore Technologies, Великобритания, SQK-LSK109 или SQK-LSK114).

Для упрощения сборки нанопоровых прочтений их предварительно сортировали по таксономическим и качественным признакам с помощью набора программ Barapost [14]. Обработанные прочтения использовали для *de novo* сборки геномов при помощи программ Flye v.2.9.3 и Canu v.2.2. Для исправления ошибок, характерных для нанопоровых данных, использовались прочтения, полученные на приборе MiSeq, в которых с помощью утилиты Trimmomatic v.0.39 были удалены низкокачественные (Q <18) и адаптерные последовательности.

Копийность плазмид рассчитывали по соотношению степени покрытия прочтениями плазмиды и последовательности хромосомы. Аннотацию нуклеотидных последовательностей проводили с помощью конвейера аннотации прокариотических геномов (PGAP) [15]. Поиск детерминант антибиотикорезистентности, точечных мутаций, связанных с резистентностью, и некоторых других классов генов осуществляли с использованием программных продуктов ResFinderFG-2.0 [16], AMRFinderPlus [17] и CARD [18]. Поиск генов патогенности и вирулентности выполняли с использованием программ VirulenceFinder v.2.0.5 и PathogenFinder, представленных на сайте Центра геномной эпидемиологии и ресурса VFDB (Virulence Factor Database) [19]. Для обнаружения генетических детерминант, ответственных за продукцию вторичных метаболитов, в том числе бактериоцинов, применяли программы BAGEL4 [16], PRISM v4.4.5 [20] и AntiSMASH 7.0 [21]. Поиск профаговых последовательностей в анализируемых геномах осуществляли с помощью веб-сервера PHASTEST [21]; систем CRISPR-Cas с помощью — CRISPRCasFinder, информацию о системах рестрикции-модификации брали в базе данных REBASE [22].

Результаты и обсуждение

Полученные в результате полногеномного секвенирования и последующей *de novo* сборки нуклеотидные последовательности хромосом изучаемых бактерий сравнивали с типовыми геномами прокариот из Банка данных Национального центра биотехнологической информации США (NCBI) с помощью сервиса «DFAST Quality Control» для уточнения таксономического статуса исследуемых штаммов. Результаты сходства видов на основании расчета средней нуклеотидной идентичности (СНИ) представлены в таблице 1. Таксономический статус штамма *L. lactis* NZ3900 следует заменить на *Lactococcus cremoris*, поскольку бактерии, ранее классифицированные как *L. lactis* subsp. *cremoris*, в 2021 г. выделены в отдельный вид *L. cremoris* [23]. Наибольшая степень сходства штамма NZ3900 выявлена с типовым штаммом вида *L. cremoris* (номера в коллекциях ATCC 19257 и LMG 6897). Как видно из таблицы 1, СНИ секвенированного нами генома *Lc. rhamnosus* БИМ B-189 и депонированных последовательностей данного штамма другими исследователями близка к 100%. Дополнительно решалась задача установить копийность плазмиды pLF14, введенной в клетки данных бактерий. На основании данных секвенирования, плазмида pLF14 независимо реплицируется в клетках бактерий *Lc. rhamnosus* БИМ B-189, среднее число копий на клетку равно 29.

Таксономический статус бактерий *L. lactis* БИМ B-1834 был подтвержден, хромосомная последовательность имеет наибольшую степень сходства с последовательностями типового штамма *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, депонированными в GenBank под номерами соответствующих коллекций ATCC 19435, DSM 20481 и др. При сборке генома *L. lactis* БИМ B-1834 было выявлено, что помимо хромосомы, бактерии содержат три плазмиды — 38 149 п. н., 35 023 п. н. и 25 060 п. н., им присвоены обозначения

Таблица 1

Результаты сравнения нуклеотидной последовательности хромосом исследуемых бактерий с типовыми геномами прокариот

Исследуемый штамм	Ближайшие родственные штаммы из баз данных NCBI (код доступа в базе данных Assembly NCBI)	СНИ, % (выровнено, %)
L. lactis NZ3900	*Lactococcus cremoris* ATCC 19257 (GCA_002441765.1)	98,16 (75,99)
	Lactococcus cremoris subsp. *tructae* DSM 21502 (GCA_002441825.1)	98,06 (79,18)
	Lactococcus cremoris LMG 6897 (GCA_001622295.1)	98,01 (76,44)
Lc. rhamnosus БИМ В-189	*Lacticaseibacillus rhamnosus* DSM 20021 (GCA_001435405.1)	100,00 (98,56)
	Lacticaseibacillus rhamnosus NCTC 13764 (GCA_900636965.1)	99,99 (99,84)
	Lacticaseibacillus rhamnosus NRRL B-442 (GCA_002849515.1)	99,99 (98,44)
	Lacticaseibacillus rhamnosus NBRC 3425 (GCA_007990855.1)	99,98 (96,98)
L. lactis БИМ В-1834	*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 19435 (GCA_001456385.1)	98,79 (85,49)
	Lactococcus lactis subsp. *lactis* JCM 5805 (GCA_000835975.1)	98,67 (86,51)
	Lactococcus lactis DSM 20481 (GCA_029023865.1)	98,66 (88,05)

pLL1834-38, pLL1834-35 и pLL1834-25 соответственно. Низкая копийность плазмид и размер, соответствующий размеру фрагментированной хромосомной ДНК, не позволили идентифицировать присутствие природных плазмид с помощью электрофореза в агарозном геле на этапе отбора штаммов (данные в печати). Плазмида pLL1834-38 содержится в клетках в одиночной копии и почти идентична (более 99% при покрытии 99%) депонированным в GenBank плазмидам *L. lactis* pIBB417_PrSa_2 (CP087701.1) и безымянной плазмиде штамма FDAARGOS_867 (CP084188.1). Плазмида pLL1834-25 имеет наибольшую степень сходства (99,06%) с последовательностью pNCDO557A (PP589826.1), а pLL1834-35 — 99,69% идентичность с плазмидой pUCCL620B (PP556492.1) с покрытием 51 и 78% соответственно, клетки содержат 1–2 копии обеих плазмид. Для штаммов, выделенных из молочных продуктов, замечена тенденция к сокращению размера хромосомы параллельно с приобретением новых признаков, кодируемых плазмидами, что, как считается, сыграло важную роль в их адаптации к богатой питательными веществами молочной среде [24]. Плазмида pLL1834-25 содержит гены структурных белков пилей и сортаз, участвующих в их сборке. В последовательностях pLL1834-35 и pLL1834-38 аннотированы детерминанты, кодирующие факторы устойчивости к тяжелым металлам, компоненты системы рестрикции-модификации. Плазмида pLL1834-38 содержит кластер генов синтеза бактериоцина (предположительно лактококцина) и гены синтеза белков, ответственных за мобилизацию. Плазмиды, являющиеся мобильными элементами, являются нежелательными компонентами геномов штаммов, используемых для генно-инженерного конструирования. Однако генетические детерминанты, кодируемые плазмидами, могут иметь важное значение для ферментативной, адаптационной и пробиотической активности штамма *L. lactis* БИМ В-1834.

Собранные последовательности геномов ис-

следуемых штаммов были депонированы в нуклеотидную базу данных NCBI, коды доступа и общие характеристики аннотированных геномов представлены в таблице 2. С учетом депонированных нами последовательностей, на 11.09.2024 г. в базе данных GenBank находится 724 секвенированные последовательности геномов *L. lactis*, из которых 81 является полностью собранными; 204 последовательности *L. cremoris*, из которых 31 является полностью собранными; 663 генома бактерий *Lc. rhamnosus*, из которых 75 являются полностью собранными.

При оценке бактерий, рассматриваемых в качестве кандидатов в продуценты гомологичных или гетерологичных белков, важным критерием является потенциальная стабильность генома. Для этого необходимо выявить наличие в пределах нуклеотидной последовательности мобильных генетических элементов, таких как инсерционные последовательности (IS-элементы), транспозоны, профаги и иные фрагменты чужеродной ДНК, которые, перемещаясь в пределах генома, могут инактивировать гены или регуляторные элементы, влияющие на продукцию целевого белка.

В геноме *Lb. rhamnosus* БИМ В-189 найдено 10 генов транспозаз семейства ISLrh2, 15 — семейства IS30, 1 — семейства IS607 и 3 — семейства IS200/IS605 (один из которых дефектный), 1 — семейства IS5/IS1182 (также дефектный) и 1 дефектный ген неустановленного семейства. После сборки данного генома и выравнивания прочтений на полученную последовательность репликона было замечено, что крупный локус (с 2 316 741 по 2 362 729 п. н.), ограниченный с обеих сторон последовательностью транспозаз семейства IS200/IS605, имеет два варианта направления (около 60% — как в депонированной последовательности и около 40% — в инверсированном направлении), что может свидетельствовать о перестройках этой части бактериальной хромосомы.

В геноме *L. cremoris* NZ3900 обнаружено 80 генов транспозаз, однако из них 32, вероятно, являются дефектными: содержат неполную последовательность или внутренний стоп-кодон. Среди предсказанных функционально активных генов транспозаз 7 принадлежат семейству IS712, 6 — семейству IS905, 15 — семейству IS3, 14 — семейству IS981 и по одному гену — семействам ISLla2, ISLla3, ISS1N, IS1675, ISS1S и IS1216. Мы выравнивали геномную последовательность *L. cremoris* NZ3900 на последовательность MG1363 (NC_009004.1), чтобы сравнить положение генов транспозаз двух штаммов. Ре-

Таблица 2

Общие характеристики геномов исследуемых бактерий

Параметр	***L. cremoris* NZ3900**	***L. lactis* БИМ В-1834**	***Lc. rhamnosus* БИМ В-189**
Общее количество генов	2 599	2 573	2 775
Количество генов, кодирующих белки	2 395	2 413	2 650
Гены РНК	86	87	80
Гены рРНК (5S, 16S, 23S)	7, 6, 6	7, 6, 6	5, 5, 5
Гены тРНК	64	64	60
Гены некодирующих РНК	3	4	3
Псевдогены	118	73	45
Процент ГЦ-пар, %	35,5	35,0	47,0
Репликоны	хромосома (CP157379.1)	хромосома (CP157287.1); три плазмиды (CP157288.1; CP157289.1; CP157290.1)	хромосома (CP158111.2)
Размер хромосомы, п. н.	2 539 931	2 432 875	2 994 346

зультат выравнивания последовательности *L. cremoris* NZ3900 относительно MG1363 (NC_009004.1) показал, что дефектные транспозазы присутствуют и в геноме исходного штамма. Значительное число неактивных IS-элементов штамма MG1363 отмечено и в работе У. Вегмана с соавторами [25]. Дополнительно на основании выравнивания двух геномов установлены локализация и кодирующие последовательности вставок в хромосому, осуществленные на этапе создания штамма *L. cremoris* NZ3900, в том числе регуляторные гены *nisRK*, участвующие в активации низинового промотора, и локус, содержащий ген *lacF* с делецией [13].

В пределах генома штамма *L. lactis* БИМ B-1834 обнаружено 35 генов транспозаз семейств IS30, IS3, ISLla3, IS981, IS6, IS982 и ISS1S, имеющих как хромосомную, так и плазмидную локализацию. Помимо вышеперечисленных генов транспозаз в пределах хромосомной последовательности штамма *L. lactis* БИМ B-1834 локализовано 3 дефектных гена транспозаз семейств IS3 и IS-LL6, в пределах плазмиды pLL1834-35 — 3 дефектных гена транспозаз семейств IS5/IS1182 и IS6, в пределах плазмиды pLL1834-38 — 5 дефектных генов транспозаз семейств IS3, IS982 и IS6.

В результате анализа с помощью веб-ресурса PHASTEST в геномах штаммов обнаружены последовательности профагов (табл. 3). У бактерий *Lb. rhamnosus* БИМ B-189 обнаружена одна полная и одна сомнительная профаговые области. Было замечено, что степень покрытия прочтениями области интактного фага в полтора раза выше, чем локусов, фланкирующих данную область, на основании чего было сделано предположение об активности данного фага у части клеток культуры. Следует отметить, что при культивировании бактерий данного штамма на поверхности питательной среды в течение 7–14 дней не было замечено зон лизиса. При спонтанной активации профагов только небольшая субпопуляция клеток начинает продуцировать бактериофаги. Этот процесс может быть вызван внешними факторами или может быть результатом внутриклеточных процессов [26, 27]. В недавних исследованиях было показано, что при анализе 1 472 геномов представителей 16 различных видов рода *Lactobacillus* фрагменты профагов

Таблица 3

Характеристика полных профаговых областей в геномах бактерий *Lb. rhamnosus* БИМ B-189, *L. cremoris* NZ3900 и *L. lactis* БИМ B-1834

Номер региона	Координаты в хромосоме	Длина региона, п. н.	Количество КБП в регионе	ГЦ, %	Ближайший известный фаг
Lb. rhamnosus БИМ B-189					
1	839 901–885 408	45 508	58	43,96	Lactob_BH1 (NC_048737)
L. cremoris NZ3900					
1	26 448–61 197	34 750	32	35,18	Lactoc_bIL310 (NC_002669)
2	802 363–845 421	43 059	63	35,05	Lactoc_PLgT_1 (NC_031016)
3	2 072 031–2 118 494	46 464	68	35,88	Lactoc_bIL286 (NC_002667)
L. lactis БИМ B-1834					
1	473 854–495 119	21 266	33	33,47	Lactoc_bIL312 (NC_002671)
2	1 025 268–1 069 331	44 064	50	35,12	Lactoc_bIL285 (NC_002666)
3	1 597 799–1 640 400	42 602	61	35,73	Strept_phi3396 (NC_009018)
4	1 773 775–1 801 392	27 618	20	33,65	Lactoc_bIL311 (NC_002670)
5	1 948 508–2 007 433	58 926	68	35,67	Lactoc_ul36 (NC_004066)
6	2 213 579–2 255 495	41 917	52	36,19	Lactoc_28201 (NC_031013)

были идентифицированы почти у всех лактобацилл (99,8%), при этом у 64,1% штаммов предсказаны последовательности интактных профагов [28]. Большинство умеренных фагов не приводят непосредственно к лизису или ингибированию роста микроорганизмов, более того, наличие фаговых последовательностей в геномах бактерий увеличивает их генетическое разнообразие, что может способствовать более легкой колонизации новых экологических ниш [26]. Тем не менее, для используемых в биотехнологических процессах бактерий крайне нежелательно наличие интактных профагов, способных к переходу к литическому циклу.

В пределах нуклеотидной последовательности штамма *L. cremoris* NZ3900 выявлено три полные, одна сомнительная и две неполные профаговые последовательности, а в пределах генома штамма *L. lactis* БИМ B-1834 обнаружено шесть полных и одна неполная профаговые последовательности. Степень покрытия прочтениями фаговых областей не отличалась от среднего покрытия хромосомы, локализация фаговых последовательностей *L. cremoris* NZ3900 соответствует их расположению в геноме MG1363.

В геномах исследуемых штаммов были обнаружены гены, относящиеся к системе рестрикции-модификации: у *Lb. rhamnosus* БИМ B-189 компоненты системы R-M типа I, II и IV. В геноме штамма *L. cremoris* NZ3900 локализованы компоненты системы R-M типа I. В нуклеотидной последовательности штамма *L. lactis* БИМ B-1834 компоненты систем R-M имеют как хромосомную, так и плазмидную локализацию. В частности, в пределах хромосомы локализованы гены системы R-M типа I; в пределах плазмиды pLL1834-35 — также гены системы R-M типа I, но в кодирующей белок последовательности (КБП) эндонуклеазы рестрикции содержится внутренний стоп-кодон; в пределах плазмиды pLL1834-25 — гены системы R-M типа II.

Систем CRISPR-Cas в исследуемых последовательностях геномов обнаружено не было.

Несмотря на то, что МКБ признаны безопасными, распространение генов устойчивости к антибиотикам и факторов вирулентности среди бактерий обуславливает необходимость детального анализа генома на наличие соответствующих генетических детерминант. Сравнение нуклеотидных последовательностей штаммов *L. lactis* БИМ B-1834, *L. cremoris* NZ3900 и *Lc. rhamnosus* БИМ B-189 с курируемыми базами данных эталонных генов антибиотикорезистентности, генов кислото-, биоцидо-, металло- и термоустойчивости с помощью сервиса AMRFinderPlus не выявило в геномах исследуемых штаммов перечисленных детерминант устойчивости, а инструмент CARD в геноме лактококков обнаружил сходство с референсной последовательностью VanY (риск устойчивости к ванкомицину), однако степень сходства низкая (32,74% у штамма NZ3900 и 32,34% у штамма 1834 при покрытии около 89% в обоих случаях). Специализированные базы данных содержат последовательности генов клинически значимых патогенов и не включают детерминанты устойчивости непатогенных и некультивируемых бактерий. ResFinderFG v2.0 включает базу данных генов антибиотикорезистентности, выявленных методом функциональной метагеномики, и позволяет обнаружить гены устойчивости, которые не были обнаружены с помощью других баз данных [16]. Анализ с помощью данного инструмента предсказал возможную устойчивость штамма *L. lactis* БИМ B-1834 к триметоприму, а штамма *L. cremoris* NZ3900 — к D-циклосерину. В обоих случаях детерминантой устойчивости определен фермент-мишень соответствующего антимикробного средства: дигидрофолатредуктаза и D-аланин-D-аланиновая лигаза. Согласно сведениям, представленным в литературных источниках, штаммы *L. lactis* обладают устойчивостью к триметоприму [29], резистентность к которому обычно связана с наличием нечувствительной дигидрофолатредуктазы [30], сведений об устойчивости лактококков к циклосерину не удалось найти. С помощью биоинформатических ресурсов не было обнаружено детерминант резистентности у штамма *Lc. rhamnosus* БИМ B-189, однако ранее нами с помощью фенотипических тестов была выявлена устойчивость к канамицину и гентамицину в концентрации 20 мкг/мл (данные в печати), устойчивость лактобацилл к аминогликозидам продемонстрирована в работе И. Кампеделли с соавторами [31]. Резистентность к аминогликозидам

связана с несколькими механизмами, одним из которых является инактивация препарата модифицирующими ферментами (ацетилтрансферазами и фосфотрансферазами), характеризующимися большим разнообразием структуры, что затрудняет их идентификацию [32].

Сравнение геномов *L. lactis* БИМ B-1834, *L. cremoris* NZ3900 и *Lc. rhamnosus* БИМ B-189 с записями из специализированных баз данных с помощью сервиса VirulenceFinder v.2.0.5 не обнаружило известных генов вирулентности патогенных бактерий *Listeria*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus*; по результатам анализа последовательностей с помощью инструмента PathogenFinder для всех трех штаммов установлена низкая вероятность патогенности (0,097–0,128). При анализе геномов с помощью инструмента VFanalyser базы данных VFDB (Virulence Factor Database) в геномах всех исследуемых бактерий были выявлены генетические детерминанты, продукты которых у патогенных бактерий участвуют в патогенезе, в том числе енолаза, фибронектин-связывающий белок, белки биосинтеза экзополисахаридов (ЭПС), сортаза, адгезины и др. (табл. 4). Однако для пробиотического штамма данные детерминанты являются предпочтительными, поскольку способствуют агрегации клеток и адгезии и играют важную

Таблица 4

Результаты анализа геномов с помощью сервиса VFDB

Функция	**Фактор вирулентности**	**Референсный ген**	***Lc. rhamnosus* БИМ B-189**	***L. cremoris* NZ3900**	***L. lactis* БИМ B-1834**
Адгезия	Фибронектин-связывающие белки	*fbp54* *pavA*	+ (*fbp54*)	+ (*pavA*)	+ (*pavA*)
	Сортаза А	*srtA*	–	+	+
	Стрептококковая липопротеиновая ротамаза А	*slrA*	–	+	+
	Стрептококковый рецептор плазмина/GAPDH	*plr/gapA*	+	+	+
	Белок адгезии листерий	*lap*	+	+	+
Ферменты	Митогенный фактор 2	*mf2*	–	+	+
	Стрептококковая энолаза	*eno*	+	+	+
Защита от иммунитета	Белки биосинтеза капсулы		5 генов	13 генов	11 генов
	Белки синтеза полисахаридной капсулы	*epsE, galE1*	+, +	+, +	+, +
Поглощение марганца	Пневмококковый поверхностный антиген А/Металлсвязывающий белок SloC	*psaA*	+	+	+
Протеазы	Триггерный фактор	*tig/ropA*	+	+	+
Токсины	Гемолизин	*	+	+	+
Защита от фагоцитоза	Гены биосинтеза капсулы		2 гена	4 гена	2 гена
	Нуклеозиддифосфат-киназа микобактерии	*ndk*	+	–	–
Регуляция	LisR/LisK, VirR/VirS (*Listeria*)	*lisR* *virR*	+ +	+ –	+ –
Системы секреции	T6CC-II	*	+	+	+

Окончание таблицы 4

Функция	Фактор вирулентности	Референсный ген	*Lc. rhamnosus* БИМ B-189	*L. cremoris* NZ3900	*L. lactis* БИМ B-1834
Закрепление поверхностных белков	Диацилглицерил-трансфераза (*Listeria*)	*lgt*	+	–	–
Устойчивость к антигенам сыворотки	LPS rfb локус (*Klebsiella*)	*	–	+	+

Примечание. * — программа не приводит название референсного гена

роль на этапе колонизации кишечника хозяина [33].

Результаты поиска генов, связанных с синтезом вторичных метаболитов, представлены в таблице 5. Присутствие кластеров синтеза бактериоцинов в геномах штаммов определили все три использованных инструмента: AntiSMASH, PRISM и BAGEL4. Так, в геноме *Lc. rhamnosus* БИМ B-189 предсказан кластер синтезируемого на рибосоме и посттрансляционно модифицируемого пептида (класс «RiPP-like» в AntiSMASH), по расположению и составу кодирующих последовательностей соответствующий идентифицированному PRISM v4.4.5 «вероятному бактериоцину класса II/III», который ресурсом BAGEL4 аннотирован как «Карноцин_CP52» на основании сходства аминокислотной последовательности (73,56%) с бактериоцином из соответствующей базы данных.

В геноме штамма *L. cremoris* NZ3900 все три используемых веб-ресурса показали наличие локусов синтеза двух бактериоцинов (табл. 5), аннотированных BAGEL4 как лактококцин A и «сактипептид S» (в AntiSMASH «пептид, модифицируемый ферментами, катализирующими радикальные реакции с участием особой молекулы S аденозилметионина», класс «RaS-RiPP») [34]. Третий возможный кластер синтеза бактериоцина у бактерий *L. cremoris* NZ3900 предсказан только BAGEL4, наибольшее сходство кодируемого пептида определено с гарвиацином Q [35].

Результаты предсказания детерминант биосинтеза бактериоцинов в геноме *L. lactis* БИМ B-1834 различались: с помощью PRISM v4.4.5 идентифицирован только кластер синтеза бактериоцина класса II/III, с помощью BAGEL4 предсказаны кластеры синтеза лактококцина B и сактипептида S. Результат анализа в AntiSMASH подтверждает наличие обоих данных кластеров и дополнительно предсказывает присутствие еще одного кластера класса RaS-RiPP в хромосоме и в последовательности плазмиды RiPP-like. Полученные результаты подтверждают имеющиеся в публикациях сведения о синтезе ряда вторичных метаболитов, в том числе бактериоцинов, представителями МКБ [36], а также демонстрируют, что использование различных био-

Таблица 5

Предсказанные кластеры синтеза вторичных метаболитов в геномах МКБ

Штамм	Кластеры биосинтеза (координаты в геноме)		
	BAGEL4	PRISM v4.4.5	AntiSMASH
Lc. rhamnosus БИМ B-189			T3PKS (1 822 328–1 863 500)
		Поликетиды (2 170 152–2 174 316)	
	Карноцин_CP52 (2 450 820–2 476 667)	Вероятный бактериоцин класса II/III (2 460 329–2 466 670)	RiPP-like (2 447 068–2 458 618)

Окончание таблицы 5

Штамм	Кластеры биосинтеза (координаты в геноме)		
	BAGEL4	**PRISM v4.4.5**	**AntiSMASH**
L. cremoris NZ3900			Беталактон (606 940–639 505)
	Лактококцин_A (706 865–726 973)	Вероятный бактериоцин класса II/III (716 828–718 038)	RiPP-like (684 721–722 032)
	Гарвиацин Q (834 941–855 082)		
			T3PKS (901 983–943 137)
		Поликетиды (1 774 220–1 777 778)	
	Сактипептиды (2 388 698–2 410 816)	Streptide (2 397 232–2 404 510)	RaS-RiPP (2 387 923–2 414 329)
L. lactis БИМ B-1834	Лактококцин_B (65 222–85 291)	Вероятный бактериоцин класса II/III (55 447–86 231)	RiPP-like (60 399–83 280)
			Беталактон (631 243–663 775)
		Поликетиды (774 857–785 313)	
			RaS-RiPP (1 162 194–1 185 411)
			T3PKS (1 549 173–1 590 327)
	Сактипептиды (2 283 950–2 303 950)		RaS-RiPP (2 281 055–2 304 958)
pLL1834-38			RiPP-like (5 963–16 130)

Примечание. T3PKS — поликетидная синтаза третьего типа; RiPP-like — синтезируемый на рибосоме и посттрансляционно модифицируемый пептид; RaS-RiPP — пептид, синтезируемый на рибосоме и посттрансляционно модифицируемый ферментами, катализирующими радикальные реакции с участием особой молекулы S-аденозилметионина

информатических ресурсов позволяет более полно предсказать наличие кластеров биосинтеза в геноме.

В рамках данного исследования мы не ставили задачу определения пробиотического потенциала штаммов, но присутствие в анализируемых геномах факторов адгезии и бактериоцинов позволяет предположить наличие способности адаптироваться и выживать в кишечнике хозяина.

Заключение

В исследуемых геномах не выявлены гены, которые могут вызывать опасения относительно возможной передачи устойчивости к антибиотикам патогенным бактериям, не обнаружено токсинов и суперантигенов, ассоциированных с вирулентностью. Все три штамма определены как непатогенные для человека, на основании чего можно сделать заключение о безопасности штаммов *L. lactis* БИМ B-1834, *L. cremoris* NZ3900 и *Lc. rhamnosus* БИМ B-189. Выявлено присутствие кластеров синтеза вторичных метаболитов, в том числе бактериоцинов, детерминант, отвечающих за агрегацию клеток и адгезию, что может обеспечивать преимущество данным бактериям на этапе колонизации кишечника хозяина.

Анализ мобилома штаммов показал наличие мобильных генетических элементов во всех геномах, однако с учетом планируемого использования штаммов отдельные элементы имеют особое значение. К таковым относятся три плазмиды pLL1834-38, pLL1834-35 и pLL1834-25 бактерий *L. lactis* БИМ В-1834, в пределах которых выявлены гены транспозаз, а плазмида pLL1834-38 содержит кодирующие последовательности белков мобилизации, предполагающих возможность конъюгативного переноса. Основываясь на ранее полученных результатах, данные плазмиды не препятствовали трансформации бактерий векторами с совместимыми репликонами, однако при использования штамма для экспрессии гетерологичных генов предпочтителен вариант с элиминацией природных плазмид. Признаки динамичности генома бактерий *Lc. rhamnosus* БИМ В-189 — активация профага и инверсивная перестройка протяженного локуса генома у части клеток популяции — свидетельствуют о нестабильности генома данных бактерий, возможность индукции лизиса клеток является нежелательной характеристикой для бактерий, рассматриваемых в качестве основы систем экспрессии. В геномах *L. lactis* БИМ В-1834 и *L. cremoris* NZ3900 присутствует несколько профаговых последовательностей, однако анализ данных секвенирования не выявил признаков активности профагов, а многолетнее использование штамма *L. cremoris* NZ3900 для продукции различных гетерологичных белков косвенно подтверждает стабильность данного генома.

Таким образом, из коллекционных штаммов *L. lactis* БИМ В-1834 имеет более стабильный геном и может быть использован в качестве реципиента экспрессионных конструкций при условии элиминации природных плазмид.

Список использованных источников

1. Editorial: Lactic Acid Bacteria: Microbial Metabolism and Expanding Applications / J.-M. Liu [et al.] // Front. Bioeng. Biotechnol. – 2021. – Vol. 9. – P. 794 164.

2. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic / C. Hill [et al.] // Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol. – 2014. – Vol. 11, № 8. – P. 506–514.

3. Lactococci and lactobacilli as mucosal delivery vectors for therapeutic proteins and DNA vaccines / L. G. Bermúdez-Humarán [et al.] // Microb. Cell Factories. – 2011. – Vol. 10, № 1. – P. S4.

4. Lactic Acid Bacteria as a Live Delivery System for the in situ Production of Nanobodies in the Human Gastrointestinal Tract / B. del Rio [et al.] // Front. Microbiol. – 2019. – Vol. 9.

5. Novel Strategies for Efficient Production and Delivery of Live Biotherapeutics and Biotechnological Uses of Lactococcus lactis: The Lactic Acid Bacterium Model / L. M. Tavares [et al.] // Front. Bioeng. Biotechnol. – 2020. – Vol. 8.

6. Recent advances in genetic tools for engineering probiotic lactic acid bacteria / K. Mugwanda [et al.] // Biosci. Rep. – 2023. – Vol. 43, № 1. – P. BSR20211299.

7. Peng, X. Whole genome sequencing for the risk assessment of probiotic lactic acid bacteria / X. Peng, A. Ed-Dra, M. Yue // Crit. Rev. Food Sci. Nutr. – 2023. – Vol. 63, № 32. – P. 11 244–11 262.

8. Carrillo, C. D. Whole-Genome Sequence Datasets: A Powerful Resource for the Food Microbiology Laboratory Toolbox / C. D. Carrillo, B. W. Blais // Front. Sustain. Food Syst. – 2021. – Vol. 5.

9. Systematic discovery of antiphage defense systems in the microbial pangenome / S. Doron [et al.] // Science. – 2018. – Vol. 359, № 6 379. – P. eaar4120.

10. Use of Wild Type or Recombinant Lactic Acid Bacteria as an Alternative Treatment for Gastrointestinal Inflammatory Diseases: A Focus on Inflammatory Bowel Diseases and Mucositis / R. D. D. O. Carvalho [et al.] // Front. Microbiol. – 2017. – Vol. 8. – P. 800.

11. Development of a novel expression system in lactic acid bacteria controlled by a broad-host-range promoter PsrfA / C. Guan [et al.] // Microb. Cell Factories. – 2022. – Vol. 21, № 1. – P. 23.

12. Draft Genome Sequence of Lactobacillus rhamnosus NRRL B-442, a Potential Probiotic Strain / M. S. Muyyarikkandy [et al.] // Genome Announc. – 2018. – Vol. 6, № 7. – P. e00046-18.

13. NICE_Expression_System-Handbook [Электронный ресурс]. – Режим доступа: https://www.mobitec.com/media/datasheets/mobitecgmbh/NICE_Expression_System-Handbook.pdf. – Дата доступа: 12.01.2023.

14. Sikolenko, M. A. Barapost: Binning of Nucleotide Sequences According to Taxonomic

Annotation / M. A. Sikolenko, L. N. Valentovich // IEEE/ACM Trans. Comput. Biol. Bioinform. – 2021. – Т. 18, № 6. – С. 2 766–2 767.

15. NCBI prokaryotic genome annotation pipeline / T. Tatusova [et al.] // Nucleic Acids Res. – 2016. – Vol. 44, № 14. – P. 6 614–6 624.

16. ResFinderFG v2.0: a database of antibiotic resistance genes obtained by functional metagenomics / R. Gschwind [et al.] // Nucleic Acids Res. – 2023. – Vol. 51, № W1. – P. W493–W500.

17. AMRFinderPlus and the Reference Gene Catalog facilitate examination of the genomic links among antimicrobial resistance, stress response, and virulence / M. Feldgarden [et al.] // Sci. Rep. – 2021. – Vol. 11, № 1. – P. 12 728.

18. CARD 2023: expanded curation, support for machine learning, and resistome prediction at the Comprehensive Antibiotic Resistance Database / B. P. Alcock [et al.] // Nucleic Acids Res. – 2023. – Vol. 51, № D1. – P. D690–D699.

19. VFDB: a reference database for bacterial virulence factors / L. Chen [et al.] // Nucleic Acids Res. – 2005. – Vol. 33, № Database issue. – P. D325–328.

20. Comprehensive prediction of secondary metabolite structure and biological activity from microbial genome sequences / M. A. Skinnider [et al.] // Nat. Commun. – 2020. – Vol. 11, № 1. – P. 6 058.

21. The antiSMASH database version 4: additional genomes and BGCs, new sequence-based searches and more / K. Blin [et al.] // Nucleic Acids Res. – 2024. – Vol. 52, № D1. – P. D586–D589.

22. REBASE: a database for DNA restriction and modification: enzymes, genes and genomes / R. J. Roberts [et al.] // Nucleic Acids Res. – 2023. – Vol. 51, № D1. – P. D629–D630.

23. Li, T. T. Elevation of Lactococcus lactis subsp. cremoris to the species level as Lactococcus cremoris sp. nov. and transfer of Lactococcus lactis subsp. tructae to Lactococcus cremoris as Lactococcus cremoris subsp. tructae comb. nov / T. T. Li, W. L. Tian, C. T. Gu // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2019. – Vol. 71, № 3.

24. The Lactococcus lactis Pan-Plasmidome / P. Kelleher [et al.] // Front. Microbiol. – 2019. – Vol. 10. – P. 707.

25. Complete Genome Sequence of the Prototype Lactic Acid Bacterium Lactococcus lactis subsp. cremoris MG1363 / U. Wegmann [et al.] // J. Bacteriol. – 2007. – Vol. 189, № 8. – P. 3 256–3 270.

26. Occurrence and genetic diversity of prophage sequences identified in the genomes of L. casei group bacteria / P. Jarocki [et al.] // Sci. Rep. – 2023. – Vol. 13. – P. 8 603.

27. Effects of diverse environmental conditions on {phi}LC3 prophage stability in Lactococcus lactis / M. Lunde [et al.] // Appl. Environ. Microbiol. – 2005. – Vol. 71, № 2. – P. 721–727.

28. Comprehensive Scanning of Prophages in Lactobacillus: Distribution, Diversity, Antibiotic Resistance Genes, and Linkages with CRISPR-Cas Systems / Z. Pei [et al.] // mSystems. – Vol. 6, № 3. – P. e01211–20.

29. Investigating lactic acid bacteria genus Lactococcus lactis properties: Antioxidant activity, antibiotic resistance, and antibacterial activity against multidrug-resistant bacteria Staphylococcus aureus / N. Hamdaoui [et al.] // Heliyon. – 2024. – Vol. 10, № 11. – P. e31957.

30. Cloning and molecular analysis of the dihydrofolate reductase gene from Lactococcus lactis / K. Leszczyńska [et al.] // Appl. Environ. Microbiol. – 1995. – Vol. 61, № 2. – P. 561–566.

31. Genus-Wide Assessment of Antibiotic Resistance in *Lactobacillus* spp. / I. Campedelli [et al.] // Appl. Environ. Microbiol. – 2018. – Vol. 85, № 1. – P. e01738-18.

32. Extensive screening reveals previously undiscovered aminoglycoside resistance genes in human pathogens / D. Lund [et al.] // Commun. Biol. – 2023. – Vol. 6, № 1. – P. 1–10.

33. Whole-Genome Sequence of Lactococcus lactis Subsp. lactis LL16 Confirms Safety, Probiotic Potential, and Reveals Functional Traits / J. Mileriene [et al.] // Microorganisms. – 2023. – Vol. 11, № 4. – P. 1 034.

34. Benjdia, A. Radical SAM Enzymes and Ribosomally-Synthesized and Post-translationally Modified Peptides: A Growing Importance in the Microbiomes / A. Benjdia, O. Berteau // Front. Chem. – 2021. – Vol. 9. – P. 678 068.

35. Garvieacin Q, a Novel Class II Bacteriocin from Lactococcus garvieae BCC 43578 / A. Tosukhowong [et al.] // Appl. Environ. Microbiol. – 2012. – Vol. 78, № 5. – P. 1 619–1 623.

36. Tang, H. The metabolites of lactic acid bacteria: classification, biosynthesis and modulation of gut microbiota / H. Tang, W. Huang, Y.-F. Yao // Microb. Cell Graz Austria. – 2023. – Vol. 10, № 3. – P. 49–62.

O. V. Evdokimova, A. A. Muratova, A. E. Akhremchuk, M. A. Sikolenko, L. N. Valentovich

GENOME ANALYSIS OF LACTIC ACID BACTERIA PROMISING FOR THE DEVELOPMENT OF HETEROLOGOUS GENE EXPRESSION

State Scientific Institution
"Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus"
2 Kuprevich St., 220084 Minsk, the Republic of Belarus
e-mail: evdokimovalesia@gmail.com

Sequencing and *de novo* assembly of the genomes of *Lacticaseibacillus rhamnosus* BIM B-189, *Lactococcus lactis* BIM B-1834 and *Lactococcus cremoris* NZ3900 bacteria as the potential recipients of heterologous gene expression systems were performed. The *in silico* genome analysis confirmed the safety of the strains showing the absence of genes for toxins and virulence factors and determinants associated with the transfer of antibiotic resistance. Secondary metabolite synthesis clusters, including bacteriocins, were predicted for all strains. Analysis of mobile genetic elements revealed instability of the *Lc. rhamnosus* BIM B-189 genome. *L. lactis* BIM B-1834 bacteria contains three low-copy plasmids; one of them contains conjugative transfer determinants. The possibility of using these strains for the development of heterologous gene expression systems is discussed.

Keywords: *Lactococcus lactis*, *Lactococcus cremoris*, *Lacticaseibacillus rhamnosus*, whole-genome sequencing, genome annotation.

Дата поступления в редакцию: 16 сентября 2024 г.

УДК 579.66:577.15+579.842.11

М. А. Винтер, А. И. Зинченко

СОЗДАНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО БАКТЕРИАЛЬНОГО ШТАММА-ПРОДУЦЕНТА ХИТИНДЕАЦЕТИЛАЗЫ

Государственное научное учреждение
«Институт микробиологии Национальной академии наук Беларуси»
Республика Беларусь, 220084, г. Минск, ул. Акад. Купревича, 2
e-mail: rita.vinter.abc@gmail.com

Приведены результаты исследований, посвященных созданию отечественного рекомбинантного штамма *Escherichia coli*, продуцирующего хитиндеацетилазу — фермент, способный катализировать реакцию превращения химически инертного природного полимера — хитина, в полимер хитозан, который характеризуется лучшей растворимостью, биоразлагаемостью, нетоксичностью и поэтому имеет хорошие перспективы применения в медицине, пищевой промышленности и сельском хозяйстве.

В работе были использованы традиционные методы конструирования генно-инженерных бактерий, которые позволили создать штамм *E. coli*, характеризующийся продуцирующей способностью в отношении хитиндеацетилазы *Bacillus cereus*, составляющей 0,5 мг/л культуральной жидкости.

Полученные результаты могут способствовать разработке технологии, представляющей собой экологически чистую альтернативу традиционному химическому производству хитозана.

Ключевые слова: рекомбинантная бактерия, хитин, хитозан, хитиндеацетилаза, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*.

Для цитирования: Винтер, М. А. Создание рекомбинантного бактериального штамма-продуцента хитиндеацетилазы / М. А. Винтер, А. И. Зинченко // Молекулярная и прикладная генетика: сб. науч. тр. / Ин-т генетики и цитологии НАН Беларуси; редкол.: А. В. Кильчевский (гл. ред.) [и др.]. – Минск, 2024. – Т. 37. – С. 95–102.

Введение

Хитин — второй по распространенности природный полимер после целлюлозы и самое распространенное возобновляемое азотсодержащее вещество на Земле [1, 2]. Он широко представлен в клеточных стенках ракообразных, экзоскелетах насекомых, моллюсках и грибах [3].

Природный хитин обладает плотной кристаллической структурой и не растворим в обычных растворителях, что серьезно ограничивает его практическое применение [4, 5].

Хитозан — поликатионный полимер, получаемый путем деацетилирования хитина. Благодаря наличию аминогрупп хитозан обладает лучшей растворимостью, чем хитин [6].

На протяжении многих лет хитозан считается многообещающим экологически чистым полимером благодаря своей возобновляемости, биосовместимости, биоразлагаемости, нетоксичности и простоте химических модификаций [7, 8]. Применимость хитозана в медицине (системы доставки лекарств и тканевая инженерия) и других областях (продукты питания, косметика, сельское хозяйство) уже хорошо задокументированы [9–12].

Традиционный промышленный способ получения хитозана заключается в обработке хитина концентрированными растворами щелочей. Этот процесс трудно контролировать, и он может приводить к серьезному загрязнению окружающей среды [13, 14]. Кроме того, качество получаемого таким образом конечного продукта не может удовлетворять требованиям биофармацевтики [15, 16].

Хитиндеацетилаза принадлежит к суперсемейству углеводных эстераз [5]. Она может катализировать деацетилирование хитина, тем самым образуя хитозан с лучшей биосовместимостью и биоразлагаемостью [15, 17]. Таким образом, ферментативное деацетилирование хитина с помощью хитиндеацети-

лаз (рис. 1) представляет собой экологически чистую альтернативу производству хитозана [14, 18–21].

В прошлом большинство исследований хитиндеацетилазы было сосредоточено на изучении свойств этого фермента, изолированного из штаммов, выделенных из окружающей среды [22, 23]. В настоящее время основное внимание уделяется созданию высокопродуктивных штаммов с помощью технологии рекомбинантной ДНК [24, 25].

Цель исследования — создание отечественного рекомбинантного штамма *E. coli*, продуцирующего хитиндеацетилазу.

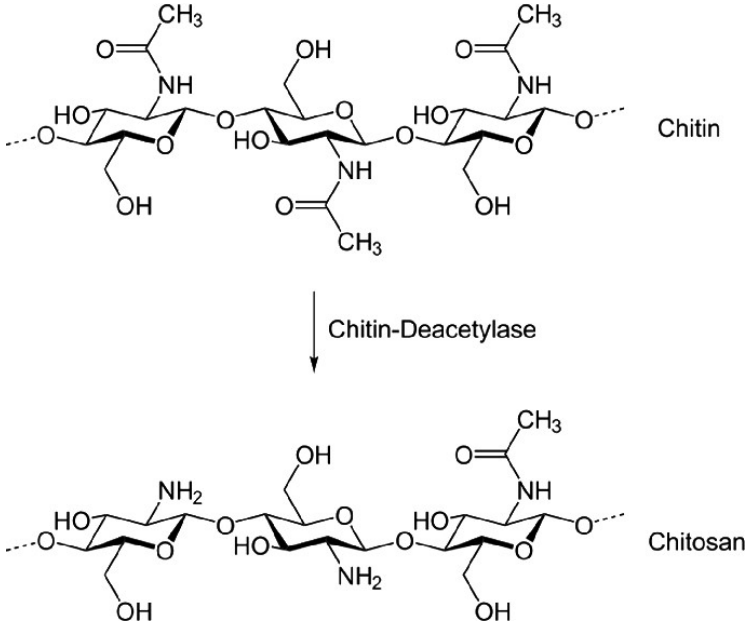

Рис. 1. Расщепление хитина до хитозана хитиндеацетилазой

Материалы и методы

Бактерии рода *Bacillus* культивировали на среде следующего состава (%): $NaNO_3$ — 0,2; K_2HPO_4 — 0,1; KH_2PO_4 — 0,1; $MgSO_4$ — 0,05; коллоидный хитин — 1; агар-агар — 1,5; при 30 °С в течение 48 ч.

Источником структурных генов *chbG* (GeneID: 72451846), кодирующего аминокислотную последовательность хитиндеацетилазы, служила хромосомная ДНК штамма *Bacillus cereus* БИМ В-170. ДНК выделяли с помощью фенол-хлороформного метода. Ген *chbG* амплифицировали с помощью ПЦР, используя «Flash-полимеразу» (АртБиоТех, Беларусь) и олигонуклеотидные праймеры:

BcerCDA_F (5′-GTGGTGGTCCACAACATGTTTTTCTTTTTTATTACGAGTAAAAGAAAC-3′),

BcerCDA_R (5′-GTGGTGGTGATGGTGATGCTCTTGAACATCTTTACTTTTCGTACTTGTATTG-3′).

На 5′-окончания праймеров встроили нуклеотидные последовательности (подчеркнуты), комплементарные плазмиде pET42a(+) (Novagen, США).

Амплификацию гена, кодирующего хитиндеацетилазу, и линеаризацию плазмиды pET-42a(+) проводили в реакционных смесях объемом 50 мкл, каждая из которых содержала: 1 ед. активности Flash-полимеразы, смесь четырех канонических дезоксинуклеозидтрифосфатов (дНТФ) (суммарно 200 мкмолей), по 20 пмоль прямого и обратного праймеров и 0,01 мкг ДНК.

Амплификацию гена проводили по следующей программе: этап предденатурации (30 сек при 98 °С); 30 циклов амплификации (7 сек при 98 °С; 10 сек при 55 °С; 30 сек при 72 °С); финальная элонгация (30 сек при 72 °С).

Линеаризацию плазмиды pET42a(+) проводили с использованием праймеров pET42linF (5'-CATATGTATATCTCCTTCTTAAAGTTAAACA AAATTATTTCTAGAG-3') и 42lnt_R (5'-GAGCATCACCATCACCACCACCACCACTAATTG-3') по следующей программе: этап предденатурации (30 сек при 98 °С);

25 циклов амплификации (10 сек при 98 °С; 15 сек при 55 °С; 3 мин 30 сек при 72 °С); финальная элонгация (3 мин 30 сек при 72 °С).

Продукты амплификации разделяли путем электрофореза в 1%-ом агарозном геле. Для определения размера фрагментов ДНК использовали маркер молекулярных масс ДНК «GeneRulerTM DNA Ladder Mix» (ThermoFisher, США). Продукт, соответствующий гену *chbG*, выделяли и встраивали в вектор pET42a(+), предварительно линеаризованный методом ПЦР.

Сборку полученных фрагментов ДНК (линеаризованного вектора и гена, кодирующего хитиндеацетилазу) осуществляли методом продолжительной перекрывающейся ПЦР (ПП-ПЦР). Продуктами ПП-ПЦР трансформировали компетентные клетки *E. coli* BL (Novagen, США) методом электропорации с использованием прибора MicroPulser Electroporator (BioRad, США), после чего высевали на плотную питательную среду LB (0,5%-й дрожжевой экстракт; 1%-й триптон; 1%-й NaCl; 1%-ая глюкоза; 2%-й агар-агар; pH 7,0), содержащую канамицин в концентрации 100 мкг/мл. Выросшие одиночные колонии анализировали на наличие вставки гена *chbG* методом ПЦР, используя праймер к T7-промотору (5′-TAATACGACTCACTATAGGG-3′), входящему в состав плазмиды pET24a+, и праймер к гену *chbG* — BcerCDA_R. Реакционная смесь объемом 20 мкл содержала: 1 ед. активности Taq-полимеразы, смесь четырех канонических дНТФ (суммарно 80 мкмолей), по 10 пмоль праймеров и ресуспендированные в смеси клетки бактерий-трансформантов.

ПЦР осуществляли по следующей программе: этап предденатурации (3 мин при 95 °С); 25 циклов амплификации (10 сек при 95 °С; 10 сек при 55 °С; 1 мин 20 сек при 72 °С); финальная элонгация (1 мин 20 сек при 72 °С).

Продукты амплификации анализировали электрофоретически в 1%-ом агарозном геле. Отбирали бактерии, клетки которых содержали плазмиду pET24a(+) со вставкой гена *chbG* в правильной ориентации.

Поверхностное культивирование трансформантов осуществляли на модифицированной среде LB, содержащей в качестве источника углерода коллоидный хитин в конечной концентрации 1% при 37 °С в течение 16 ч. Зоны утилизации хитина визуализировали с использованием красителя Конго красный в концентрации 2%.

Глубинное культивирование *E. coli* осуществляли в жидкой среде следующего состава (%): дрожжевой экстракт — 0,5; пептон — 1; глюкоза — 1; $MgSO_4$ — 0,02; Na_2HPO_4 — 0,36; KH_2PO_4 — 0,34; NH_4Cl — 29,6; Na_2SO_4 — 0,07; канамицин — 0,01.

Бактерии выращивали на термостатируемой качалке при температуре 37 °С до достижения оптической плотности культуральной жидкости (КЖ) 0,6–1,0 (λ = 600 нм), затем вносили индуктор — изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид (ИПТГ) (CarlRoth, Германия) до конечной концентрации 0,5 мМ и продолжали культивирование в течение 4 ч при температуре 37 °С. Затем клетки осаждали центрифугированием при 10 000 g в течение 5 мин. Супернатант удаляли, клетки ресуспендировали в лизирующем буфере (300 мМ NaCl; 10 мМ имидазол; 50 мМ NaH_2PO_4; pH 8,0) и разрушали ультразвуком, используя прибор Sonifier-450 (Brandson, США), при следующих режимах: мощность — 0,05 кВт; температура — 4 °С; продолжительность — 600 импульсов по 0,5 сек.

Клеточные лизаты осветляли центрифугированием при 60 000 g в течение 30 мин и надосадочную жидкость наносили на хроматографическую колонку со смолой Ni^{2+}-NTA (Qiagen, США), уравновешенную пятью объемами лизирующего буфера.

Через колонку последовательно пропускали два объема лизирующего буфера. Далее использовали 10 объемов промывочного буфера (300 мМ NaCl; 10 мМ имидазол; 50 мМ NaH_2PO_4; 0,5%-й Тритон X-100; pH 8,0) для удаления неспецифически связавшихся с колонкой белков и два объема лизирующего буфера. Рекомбинантный белок элюировали буфером, содержащим 300 мМ NaCl, 50 мМ NaH_2PO_4, 500 мМ имидазола (pH 8,0). Полученные в результате металл-аффинной хроматографии образцы белка анализировали с помощью 12%-го ДСН-полиакриламидного гель-электрофореза. Для определения молекулярных масс белков использовали стандарт «BlueEye Prestained Protein Marker» (Jena Bioscience, Германия). Концентрацию белка в образцах определяли методом Брэдфорд.

Результаты и обсуждение

Биоинформационный анализ проводили с использованием базы данных нуклеотидных последовательностей GenBank. Для поиска гена, кодирующего хитиндеацетилазу, были выбраны непатогенные бактерии, в частности бациллы, характеризующиеся широким спектром продуцируемых ферментов, что позволило сузить круг поисков до трех видов: *Bacillus cereus*, *B. licheniformis* и *B. velezensis*.

Скрининг продуцентов проводили на агаризованной среде в качестве единственного источника углерода, в которой был коллоидный хитин. Т. к. на момент проведения исследования был аннотирован ген, кодирующий хитиндеацетилазу только для *B. cereus*, в качестве референсной для этого вида была выбрана нуклеотидная последовательность *chbG* (Gene ID: 72451846). Для дальнейшей работы была выбрана ДНК *B. cereus* БИМ В-170.

Далее нами был выделен образец хромосомальной ДНК штамма *B. cereus* БИМ В-170 методом фенольной экстракции. Амплификацию гена проводили, как описано в разделе Материалы и методы исследования. Результаты представлены на рисунке 2.

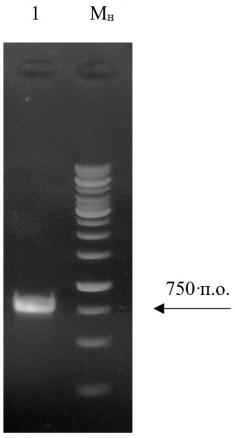

Рис. 2. Электрофореграмма продукта амплификации гена *chbG*: 1 — ампликон гена *chbG* из штамма *B. cereus* БИМ В-170; $М_н$ — маркер молекулярных масс фрагментов ДНК

Амплифицированный ген был встроен в предварительно линеаризованный вектор pET42a(+) с помощью ПП-ПЦР, в результате чего была получена генетическая конструкция, обозначенная как pET42–CDA–*B.cereus* (генетическая карта конструкции представлена на рис. 3).

Полученными плазмидами трансформирова-

Рис. 3. Генетическая карта конструкции, несущей ген *chbG B. cereus*

ли реципиентные штаммы *E. coli* BL21 (DE3) и отбирали трансформанты, содержащие плазмиду с геном *chbG*, встроенным в правильной ориентации. Скрининг выросших трансформантов осуществляли с помощью ПЦР (рис. 4).

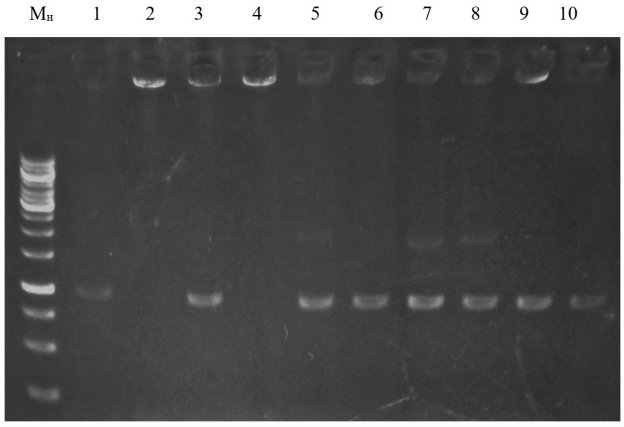

Рис. 4. Электрофореграмма продуктов ПЦР-скрининга на наличие гена хитиндеацетилазы *B. cereus*: 1–10 — ампликоны из соответствующих клонов-трансформантов; $М_н$ — маркер молекулярных масс фрагментов ДНК

Колонии трансформантов, несущие в своем составе гены *chbG*, были пересеяны и далее проанализированы на способность использовать хитин в качестве единственного источника углерода с последующим окрашиванием Конго красным (рис. 5).

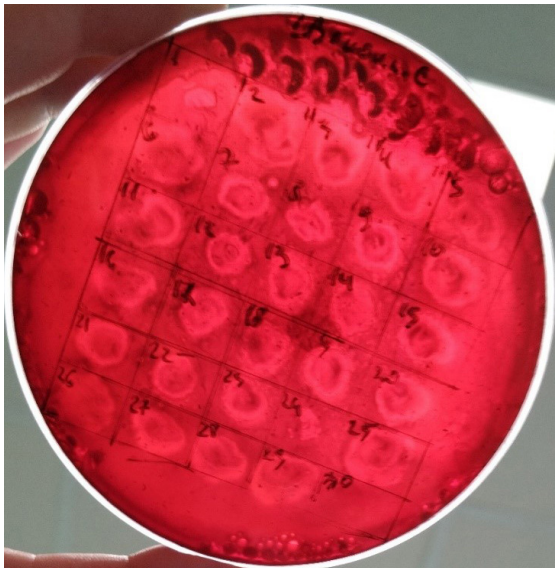

Рис. 5. Рост клонов-трансформантов на среде с коллоидным хитином

Кислый pH приводит к сдвигу спектрального максимума красителя в область больших длин волн (λ = 540–570 нм) и, соответственно, изменению цвета индикатора. Неионные взаимодействия этого красителя при нейтральных значениях pH приводят к деколоризации красителя, что позволяет использовать это свойство для количественного определения субстрата, способного вступать во взаимодействие с Конго красным. Следовательно, по зонам деколоризации Конго красного вокруг колоний клеток можно судить об их способности утилизировать хитин.

Как видно из рис. 5, вокруг всех колоний образовались более светлые зоны деколоризации красителя, что свидетельствует о продукции хитиндеацетилазы.

Индукция синтеза хитиндеацетилазы и последующая очистка фермента показала синтез трансформантами целевого белка для продуцентов *B. cereus* (рис. 6 и 7) соответственно.

Как видно из рис. 6, образуемый фермент накапливается в растворимой фракции клеточного лизата.

Продуктивность штамма в расчете на синтезируемый белок составляет 0,5 мг/л культуральной жидкости. Молекулярная масса выделенного белка равна 25 кДа, что соответствует целевому ферменту.

В плане обсуждения полученных резуль-

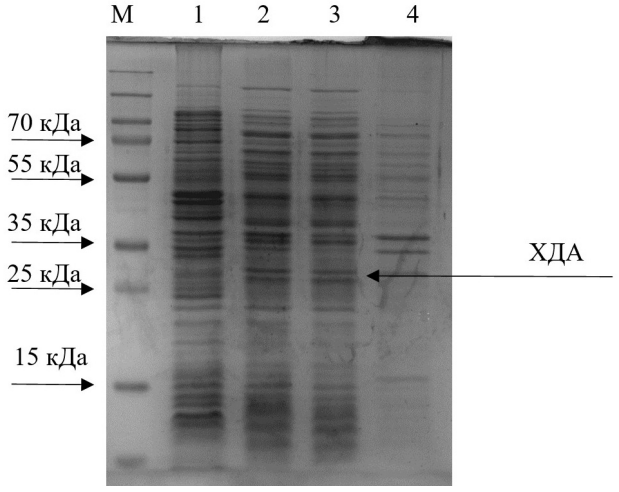

Рис. 6. Электрофореграмма белкового состава клеток *E. coli* BL, несущих плазмиду с геном *chbG*: 1 — клеточный лизат до индукции; 2 — клеточный лизат после индукции; 3 — супернатант клеточного лизата; 4 — тела включения; M — маркер молекулярной массы белка

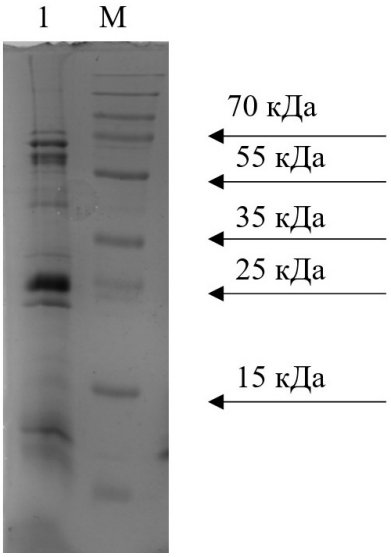

Рис. 7. Электрофореграмма хитиндеацетилазы после металл-аффинной хроматографии. М — маркер молекулярной массы белка

татов следует отметить, что утилизация хитинсодержащих отходов является актуальной проблемой, в то время как получаемый при деацелилировании хитина хитозан может служить перспективным соединением в биофармацевтике [7–12]. Продемонстрированный в настоящем исследовании биотехнологический подход для трансформации хитина в хитозан является экологичным, а также открывает возможность для получения целевого продукта с заданными свойствами для применения в медицине [17].

Заключение

Методами генной инженерии был изолирован и клонирован ген, кодирующий хитиндеацетилазу *B. cereus*. С использованием вектора pET42a(+) создана генетическая конструкция, несущая ген *chbG*, которой трансформирован штамм *E. coli* BL21 (DE3). Полученный рекомбинантный штамм способен продуцировать хитиндеацетилазу в растворимой форме в количестве 0,5 мг/л культуральной жидкости. Полученные результаты могут быть использованы для разработки технологии, представляющей собой экологически чистую альтернативу традиционному химическому производству хитозана.

Список использованных источников

1. Younes, I. Chitin and chitosan preparation from marine sources. Structure, properties and applications / I. Younes, M. Rinaudo // Mar. Drugs. – 2015. – Vol. 13. – P. 1 133–1 174. DOI: 10.3390/md13031133.

2. Upcycling chitin-containing waste into organonitrogen chemicals via an integrated process / X. Q. Ma [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2020. – Vol. 117. – P. 7 719–7 728. DOI: 10.1073/pnas.1919862117.

3. Expression and molecular modification of chitin deacetylase from *Streptomyces bacillaris* / L. L. Yin [et al.] // Molecules. – 2022. – Vol. 28. – Art. 113. DOI:10.3390/molecules28010113.

4. Extraction, characterization and antimicrobial activity of chitosan from pen shell, Pinna bicolor / B. P. Sudatta [et al.] // Int. J. Biol. Macromol. – 2020. – Vol. 163. – P. 423–430. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2020.06.291.

5. Rationally engineered chitin deacetylase from *Arthrobacter* sp. AW19M34-1 with improved catalytic activity toward crystalline chitin / Z. W. Ding [et al.] // Carbohydr. Polym. – 2021. – Vol. 274. – Art. 118637. DOI:10.1016/j.carbpol.2021.118637.

6. Liaqat, F. Chitooligosaccharides and their biological activities: A comprehensive review / F. Liaqat, R. Eltem // Carbohydr. Polym. – 2018. – Vol. 184. – P. 243–259. DOI:10.1016/j.carbpol.2017.12.067.

7. Effects of neutralization on the physicochemical, mechanical, and biological properties of ammonium-hydroxide-crosslinked chitosan scaffolds / P. H. Azueta-Aguayo [et al.] // Int. J. Mol. Sci. – 2022. – Vol. 23. – Art. 14822. DOI:10.3390/ijms232314822.

8. Reimagining chitosan-based antimicrobial biomaterials to mitigate antibiotic resistance and alleviate antibiotic overuse: a review / K. S. Dhlamini [et al.] // Macromol. Mater. Eng. – 2024. – Art. 2400018. DOI:10.1002/mame.202400018.

9. Chitosan: an overview of its properties and applications / I. Aranaz [et al.] // Polymers. – 2021. – Vol. 13, № 19. – Art. 3256. DOI:10.3390/polym13193256.

10. Amelioration of cancer employing chitosan, its derivatives, and chitosan-based nanoparticles: recent updates / T. Virmani [et al.] // Polymers. – 2023. – Vol. 15, № 13. – Art. 2928. DOI:10.3390/polym15132928.

11. Chitosan, chitosan derivatives, and chi-

tosan-based nanocomposites: eco-friendly materials for advanced applications (a review) / A. El-Araby [et al.] // Frontiers in Chemistry. – 2024. – Vol. 11. – Art. 1327426. DOI:10.3389/fchem.2023.1327426.

12. *In vivo* immunological activity of chitosan-derived nanoparticles / C. Xu [et al.] // International Journal of Biological Macromolecules. – 2024. – Vol. 262(Pt 2). – Art. 130105. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2024.130105.

13. Base-catalysed, one-step mechanochemical conversion of chitin and shrimp shells into low molecular weight chitosan / X. Chen [et al.] // Green Chem. – 2017. – Vol. 19. – P. 2 783–2 792. DOI:10.1039/C7GC00089H.

14. Purification and characterization of chitin deacetylase active on insoluble chitin from *Nitratireductor aquimarinus* MCDA3-3 / J. L. Chai [et al.] // Int. J. Biol. Macromol. – 2020. – Vol. 152. – P. 922–929. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2020.02.308.

15. Enzymatic modifications of chitin, chitosan, and chitooligosaccharides / M. B. Kaczmarek [et al.] // Front. Bioeng. Biotechnol. – 2019. – Vol. 7. – Art. 243. DOI:10.3389/fbioe.2019.00243.

16. Screening of chitin deacetylase producing microbes from marine source using a novel receptor on agar plate / G. M. Pawaskar [et al.] // Int. J. Biol. Macromol. – 2019. – Vol. 131. – P. 716–720. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2019.03.118.

17. Investigation of the effects of molecular parameters on the hemostatic properties of chitosan / Z. Hu [et al.] // Molecules. – 2018. – Vol. 23. – Art. 3147. DOI:10.3390/molecules23123147.

18. Raval, R. Expression studies of *Bacillus licheniformis* chitin deacetylase in *E. coli* Rosetta cells / R. Raval, R. Simsa, K. Raval // Int. J. Biol. Macromol. – 2017. – Vol. 104. – P. 1 692–1 696. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2017.01.151.

19. A chitin deacetylase from the endophytic fungus *Pestalotiopsis* sp. efficiently inactivates the elicitor activity of chitin oligomers in rice cells / S. Landwehr [et al.] // Sci. Rep. – 2016. – Vol. 6. – Art. 38018. DOI:10.1038/srep38018.

20. Aktuganov, G. E. Specific features of chitosan depolymerization by chitinases, chitosanases, and nonspecific enzymes in the production of bioactive chitooligosaccharides / G. E. Aktuganov, A. I. Melent'ev // Appl. Biochem. Microbiol. – 2017. – Vol. 53. – P. 611–627. DOI:10.1134/S0003683817060023.

21. Isolation, characterisation, and genome sequencing of *Rhodococcus equi*: A novel strain producing chitin deacetylase / Q. Y. Ma [et al.] // Sci. Rep. – 2020. – Vol. 10. – Art. 4329. DOI: 10.1038/s41598-020-61349-9.

22. Araki, Y. A pathway of chitosan formation in *Mucor rouxii*: Enzymatic deacetylation of chitin / Y. Araki, E. Ito // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 1974. – Vol. 56. – P. 669–675.

23. Gao, X. D. Purification and characterization of chitin deacetylase from *Absidia coerulea* / X. D. Gao, T. Katsumoto, K. Onodera // J. Biochem. – 1995. – Vol. 117. – P. 257–263.

24. Process evaluation and kinetics of recombinant chitin deacetylase expression in *E. coli* Rosetta pLysS cells using a statistical technique / G. M. Pawaskar [et al.] // Journal of Visualized Experiments: Jove. – 2023. – Vol. 193. DOI:10.3791/64590.

25. Cloning and characterization of chitin deacetylase from *Euphausia superba* / X. Wang [et al.] // International Journal of Molecular Sciences. – 2024. – Vol. 25, № 4. – Art. 2075. DOI:10.3390/ijms25042075.

M. A. Vinter, A. I. Zinchenko

ENGINEERING OF RECOMBINANT BACTERIAL CHITIN DEACETYLASE PRODUCTION STRAIN

State Scientific Institution
"Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus"
2 Kuprevich St., 220084 Minsk, the Republic of Belarus
e-mail: rita.vinter.abc@gmail.com

The study results are demonstrated on the development of the domestic recombinant strain *Escherichia coli* producing chitin deacetylase — an enzyme capable of catalyzing the reaction of the conversion of the chemically inert natural polymer chitin into the chitosan polymer, which is characterized by better solubility, biodegradability and non-toxicity, and therefore, it has good prospects for use in medicine, food industry and agriculture.

Traditional methods of constructing of genetically engineered bacteria were used in work, which made it possible to develop the *E. coli* strain characterized by the production ability of *Bacillus cereus* chitin deacetylase, which is 0.5 mg/l of the culture broth.

The results obtained may contribute to the development of technology that provides an environmentally friendly alternative to the conventional.

Keywords: recombinant bacterium, chitin, chitosan, chitin deacetylase, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*.

Дата поступления в редакцию: 11 апреля 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 реферируется и индексируется в РИНЦ (Российский индекс научного цитирования).

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

ДЛЯ ОПУБЛИКОВАНИЯ РАССМАТРИВАЮТСЯ СЛЕДУЮЩИЕ ТИПЫ СТАТЕЙ

Экспериментальная статья

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

Обзорная статья

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

Краткое сообщение

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

СТРУКТУРА СТАТЬИ

Статья набирается в текстовом редакторе Microsoft Word. Поля: верхнее и нижнее — 2 см, левое — 3 см, правое — 1,5 см. Текст набирается шрифтом Times New Roman, 12 пт, в одну колонку с одинарным межстрочным интервалом. Выравнивание — по ширине. Абзацный отступ — 1,25 см. Не допускается использование табуляции или пробелов для обозначения первой строки абзаца. *Автоматическая расстановка переносов 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, €) 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 (%, ≤, ±, ×, ≠, ∞, →, °, ∉ 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 ($q_{ср}$);

5) обозначения химических элементов и соединений (Р, H_2O);

6) названия белков;

7) скобки () и запятые (,) в формулах и после них ($x^2 - 0{,}5b(1{,}5 + ca)$).

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

Без пробелов следует проставлять:

1) дефис (-) в сложных словах (минерал-индикатор, К-пространство) и при наращении падежных окончаний к цифрам и буквам (1-го, *j*-го);

2) короткое тире (–) (Ctrl + «–» на нумерационной клавиатуре) между цифрами, обозначаю-

щими пределы какой-либо величины (20–30 чел.);

3) знаки –, +, ≤, > в значении положительной или отрицательной величины, степени увеличения или уменьшения;

4) знак %;

5) скобки () и кавычки «» от заключенных в них слов (по всей работе кавычки должны быть одного рисунка — «елочки»).

С пробелами проставлять:

1) тире (—) (Ctrl + Alt + «–» на нумерационной клавиатуре) с обеих сторон пробелом как знак препинания между словами.

2) математические знаки (–, +, ≤, ±, ·, ×, =, ∉ и др.) в формулах, уравнениях, когда они являются знаками арифметического действия ($R_1 + R_2 = 0{,}75$);

3) знаки №, § от следующих за ними чисел (№ 4);

4) многозначные целые числа, содержащие 5 и более знаков, разбиваются по 3 цифры справа налево (40 450, 8 345 458);

5) сокращенные слова от имен собственных, к которым они относятся (ул. Академическая);

6) цифры от полных или сокращенных наименований (100 м, 2005 г.).

Требования к рисункам

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

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

Слово Рис. 1**.** и подрисуночная 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 37

Ответственный за выпуск *Е. М. Гришкова*
Переводчик *М. Г. Пыжова*

Подписано в печать 15.11.2024 г. Формат 60×84 1/8. Бумага офсетная. Гарнитура Times.
Печать цифровая. Усл. печ. л. 12,79. Уч.-изд. л. 14,7. Тираж 80 экз.

Отпечатано на государственном предприятии «СтройМедиаПроект»
Свидетельство о государственной регистрации издателя, изготовителя,
распространителя печатных изданий № 2/42 от 13.02.2014.
220123, г. Минск, ул. В. Хоружей, 13/61.

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.