

ISSN 1999-9127

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

МОЛЕКУЛЯРНАЯ И ПРИКЛАДНАЯ ГЕНЕТИКА

**СБОРНИК НАУЧНЫХ ТРУДОВ
ТОМ 40**

Издается с 2005 года
Выходит два раза в год

Минск
2026

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, 2026. – Т. 40. – 116 с. – ISSN 1999-9127.

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

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

Редакционная коллегия:

А. В. Кильчевский — главный редактор,
Л. Э. Макарина-Кибак — заместитель главного редактора,
О. Ю. Баранов, К. У. Вильчук, С. И. Гриб, Е. В. Гузенко, Н. И. Дубовец,
А. Н. Евтушенков, А. П. Ермишин, А. И. Ковалевич, Ж. В. Колядич, С. А. Красный,
В. А. Лемеш, 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

СОДЕРЖАНИЕ

<i>Т. Е. Варфоломеева, И. С. Гордей, В. С. Мандрусова, А. А. Садовник</i> Молекулярно-генетическое исследование локуса <i>Fr-A2</i> в современном генофонде озимой мягкой пшеницы (<i>Triticum aestivum</i> L.) для селекции на морозостойкость	5
<i>Н. В. Гудная, А. Н. Мялик, Т. Г. Кулагина, В. В. Туток</i> Генетическое разнообразие и структура популяций равноплодника василистникового (<i>Isopyrum thalictroides</i> L.) в Беларуси	13
<i>Н. Y. Dostanko, V. E. Yagur, E. S. Siniauskaya, R. I. Goncharova</i> Genetic polymorphisms <i>STAT4</i> rs7574865, <i>PTPN2</i> rs2542151 and <i>AGER</i> rs1035798 in Belarusian patients with systemic lupus erythematosus.....	25
<i>М. Е. Никифоров, Е. Е. Кheidорова, М. V. Tarantovich, К. V. Homel</i> Taxonomic division of the common kingfisher <i>Alcedo atthis</i> (Linnaeus, 1758) in Belarus in comparison with the genetic structure of the species in the Palearctic area.....	38
<i>В. Н. Купень</i> Дифференциация биологических видов <i>Bos taurus</i> и <i>Bison bonasus</i> по результатам биоинформатического анализа геномов	53
<i>В. А. Зубарь, Т. В. Семашко, А. И. Левданская, Л. А. Жуковская</i> Клонирование и анализ гена билирубиноксидазы штамма <i>Albifimbria verrucaria</i> БИМ F-113 с перспективой гетерологичной экспрессии в клетках <i>Corynebacterium glutamicum</i>	64
<i>О. Д. Левданский, А. М. Молчун</i> Сравнительный анализ программного обеспечения для выравнивания на референсную последовательность и вызова вариантов.....	75
<i>М. А. Чиндарева, А. И. Зинченко</i> Создание рекомбинантного штамма <i>Bacillus subtilis</i> — продуцента кератиназы	82
<i>М. А. Винтер, А. И. Зинченко</i> Получение рекомбинантной хитиназы <i>Bacillus licheniformis</i> в клетках <i>Escherichia coli</i>	91
<i>А. И. Царь</i> Молекулярно-генетические методы идентификации рыб семейства лососевые (<i>Salmonidae</i>).....	100

CONTENTS

<i>T. E. Varfolomeeva, I. S. Gordey, V. S. Mandrusova, A. A. Sadovnik</i> Molecular genetic study of the <i>Fr-A2</i> locus in the modern gene pool of winter soft wheat (<i>Triticum aestivum</i> L.) for frost resistance breeding.....	5
<i>N. V. Hudnaya, A. N. Mialik, T. G. Kulahina, V. V. Titok</i> Genetic diversity and structure of populations of <i>Isopyrum thalictroides</i> L. in Belarus.....	13
<i>Н. Ю. Достанко, В. Е. Ягур, Е. С. Синявская, Р. И. Гончарова</i> Генетические полиморфизмы <i>STAT4</i> rs7574865, <i>PTPN2</i> rs2542151 и <i>AGER</i> rs1035798 у белорусских пациентов с системной красной волчанкой.....	25
<i>М. Е. Никифоров, Е. Э. Хейдорова, М. В. Тарантович, К. В. Гомель</i> Таксономическая подразделенность обыкновенного зимородка (<i>Alcedo atthis</i>) в Беларуси в сопоставлении с генетической структурой вида в палеарктическом ареале	38
<i>V. N. Kipen</i> Differentiation of biological species <i>Bos taurus</i> and <i>Bison bonasus</i> based on bioinformatic genome analysis results	53
<i>V. A. Zubar, T. V. Semashko, A. I. Levdanskaya, L. A. Zhukovskaya</i> Cloning and analysis of bilirubin oxidase of the <i>Albifimbria verrucaria</i> strain BIM F-113 with the prospect of heterologous expression in <i>Corynebacterium glutamicum</i> cells	64
<i>A. D. Liaudanski, A. M. Molchun</i> Comparative analysis of aligning and variant calling software.....	75
<i>M. A. Chindareva, A. I. Zinchenko</i> Engineering a recombinant <i>Bacillus subtilis</i> strain producing keratinase	82
<i>M. A. Vinter, A. I. Zinchenko</i> Obtaining recombinant <i>Bacillus licheniformis</i> chitinase in <i>Escherichia coli</i> cells	91
<i>N. I. Tsar</i> Molecular genetic identification techniques for <i>Salmonidae</i>	100

Т. Е. Варфоломеева, И. С. Гордей, В. С. Мандрусова, А. А. Садовник

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ЛОКУСА *Fr-A2* В СОВРЕМЕННОМ ГЕНОФОНДЕ ОЗИМОЙ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ (*TRITICUM AESTIVUM* L.) ДЛЯ СЕЛЕКЦИИ НА МОРОЗОСТОЙКОСТЬ

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

Цель работы — провести анализ основного локуса морозостойкости озимой мягкой пшеницы *Fr-A2* по CNV генов *CBF-A12*, *CBF-A14* и *CBF-A15* в современном генофонде и выделить наиболее перспективные сорто-образцы для селекции морозостойких сортов.

Объектами исследования являлись 67 образцов озимой мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.), а также пять яровых сортов, взятых в качестве контрольных образцов с пониженной морозостойкостью.

Проведен молекулярно-генетический анализ селекционного генофонда озимой мягкой пшеницы по локусу *Fr-A2*. Анализ CNV генов *CBF-A12*, *CBF-A14* и *CBF-A15* данного локуса показал полиморфизм в количестве копий генов *CBF-A14* и *CBF-A15*. Четырнадцать образцов, включая пять яровых сортов, показали наличие одной гаплоидной копии гена *CBF-A14*, 57 образцов имели две гаплоидные копии и один образец — три копии гена. Одной гаплоидной копией *CBF-A15* обладали 52 образца, включая четыре яровых сорта, и 20 образцов, включая яровой сорт Мунк, обладали двумя гаплоидными копиями гена. Все протипированные образцы показали наличие только одной гаплоидной копии гена *CBF-A12*. По результатам анализа выделен 41 образец, представляющий наибольший потенциал в качестве исходного селекционного материала для создания сортов с повышенной морозостойкостью.

Ключевые слова: пшеница мягкая, низкотемпературный стресс, зимостойкость, морозостойкость, селекция, генетические маркеры, вариации числа копий, генотипирование.

Для цитирования: Молекулярно-генетическое исследование локуса *Fr-A2* в современном генофонде озимой мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) для селекции на морозостойкость / Т. Е. Варфоломеева, И. С. Гордей, В. С. Мандрусова, А. А. Садовник // Молекулярная и прикладная генетика: сб. науч. тр. / Ин-т генетики и цитологии НАН Беларуси; редкол.: А. В. Кильчевский (гл. ред.) [и др.]. — Минск, 2026. — Т. 40. — С. 5–12.

Введение

Изменения климата, наблюдаемые за последние несколько десятков лет, оказывают существенное влияние на аграрный комплекс Республики Беларусь. Особенно это касается озимых культур, часть жизненного цикла которых приходится на зимний период. В последнее время в этот период все чаще наблюдаются значительные колебания температур, что зачастую приводит к практически полному отсутствию снежного покрова на достаточно длительный срок. Снижение температур в этот период до критически низких значений для озимых культур ($-15...-18$ °C и ниже) может

приводить к повреждению их посевов и, как следствие, к значительным потерям урожая.

Озимая мягкая пшеница (*Triticum aestivum* L.) является одной из наиболее востребованных и стратегически важных зерновых культур Республики Беларусь. Данная культура в сравнении с ближайшими родственными злаками (рожью и тритикале) является более чувствительной к низкотемпературному стрессу (гибель растений наступает уже при $-14...-16$ °C). Учитывая все большее расширение посевных площадей под эту культуру и вышеописанные изменения климата, возник запрос на исследование генетики морозоустойчивости этой куль-

туры с целью создания зимостойких сортов.

В ответ на понижение температуры у растений запускается ряд адаптационных процессов, которые включают в себя изменение протекания некоторых биохимических реакций, перестройку физиологии, изменение экспрессии генов и ее регуляции факторами транскрипции, цис-регуляторными элементами и др. [1, 2]. Эффективный ответ на низкотемпературный стресс достигается за счет наличия взаимосвязанных генетических систем [3]. Взаимная регуляция между ними осуществляется на транскрипционном, трансляционном, посттранскрипционном, посттрансляционном и эпигенетическом уровнях [4].

Центральную роль в передаче сигнала и регуляции экспрессии генов в ответ на абиотический стресс играют транскрипционные факторы — белки со специфическим ДНК-связывающим доменом, при взаимодействии которого с комплементарными цис-элементами в промоторах целевых генов происходит регуляция их экспрессии. Действие факторов транскрипции достаточно специфично, а круг генов-мишеней широк [5, 6, 7]. Сегодня известно более 40 семейств транскрипционных факторов, участвующих в передаче сигналов и регуляции ответа на снижение температуры.

Наиболее значимым в контроле устойчивости к низкотемпературному стрессу и в настоящее время наиболее изученным является ICE–CBF–COR сигнальный путь (регуляционный каскад), реагирующий также на сигналы растительных гормонов, циркадных ритмов и освещенности [8]. Он включает несколько вертикально сопряженных регулонов транскрипционных факторов (ICE, CBF) и обнаружен у пшеницы, риса, чая и других видов [9].

Основными индукторами ICE–CBF–COR сигнального пути являются белки ICE (inducer of CBF expression, индукторы экспрессии CBF) — позитивные факторы транскрипции генов CBF / DREB (C-repeat binding factor — фактор связывающий C-повтор / dehydration responsive element binding — реагирующий на обезвоживание связывающий элемент) [10, 11]. В свою очередь, белки генов CBF регулируют экспрессию генов COR (cold responsive), играющих важную роль в адаптации растений к низкотемпературному стрессу.

Признак морозостойкости на данный мо-

мент хорошо изучен у разных видов растений, и его исследование может рассматриваться как одно из наиболее перспективных направлений в селекции озимых растений. Однако тесное взаимодействие сигнальных путей различных механизмов адаптации с образованием генетических сетей затрудняет выделение наиболее эффективных маркеров для селекции по данному признаку [12].

В геноме гексаплоидных пшениц обнаружено множество локусов, ассоциированных с морозостойкостью, которые располагаются на разных хромосомах. Однако рядом исследователей показано, что центральным локусом морозостойкости пшеницы является локус *Fr-A2*, содержащий большинство генов, связанных с этим признаком [13, 14]. Данный локус находится на длинном плече 5А хромосомы пшеницы в 30 сМ от локуса *Vrn-A1*. Локус *Fr-A2* несет кластер из не менее чем 11 генов CBF, три из которых (*CBF-A12*, *CBF-A14* и *CBF-A15*) расположены в центральной части локуса и играют ключевую роль в морозостойкости растений [15, 16]. Семейство генов CBF высококонсервативно, а сами гены CBF проявляют высокую (примерно 85%) схожесть последовательностей у разных видов растений [9]. CBF-гены в геноме злаков чаще всего располагаются в кластерах тандемно дублированных паралога и взаиморегулируют друг друга.

К изменениям в данном локусе, влияющим на повышение или понижение признака морозостойкости, относятся однонуклеотидные полиморфизмы (SNP, single nucleotide polymorphism) и вариации числа копий (CNV, copy number variation) генов CBF. Гаплотипы FR-A2-S (чувствительный к холоду) и FR-A2-T (устойчивый к холоду) различаются по SNP. FR-A2-S и FR-A2-T отличаются двумя вставками/делециями и 10 однонуклеотидными полиморфизмами в генах *CBF-A12* и *CBF-A15*. *CBF-A12* содержит четыре SNP и один постоянный полиморфизм, *CBF-A15* содержит шесть SNP и один постоянный полиморфизм.

Вариации числа копий (CNV) — это полиморфизм, который представляет собой различия в индивидуальных геномах организмов одного вида по числу копий одного и того же участка хромосомы.

В геноме гексаплоидной пшеницы гены

CBF-A12, *CBF-A14* и *CBF-A15* центрального кластера локуса *Fr-A2* представлены разным количеством копий. При этом отмечается, что вариация числа копий гена *CBF-A14* вносит наибольший вклад в дисперсию признака морозостойкости (около 91,6%) [17], что позволяет выделить CNV *CBF-A14* в качестве основного маркера-кандидата для селекции морозостойких сортов [16, 18].

Целью работы являлся анализ локуса *Fr-A2*, ассоциированного с морозостойкостью, по CNV генов *CBF-A12*, *CBF-A14* и *CBF-A15* в генофонде исходного материала озимой мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) и выделение наиболее перспективных сортообразцов для селекции морозостойких сортов.

Материалы и методы

Материалом для исследования послужили 67 образцов озимой мягкой пшеницы, представленных РУП «Научно-практический центр НАН Беларуси по земледелию».

В качестве отрицательного контроля по признаку морозостойкости в анализ дополнительно включили пять яровых сортов мягкой пшеницы: Мунк, Рассвет, Анюта, Дарья, Chinese Spring.

Геномную ДНК для последующего анализа выделяли из молодых листьев с использованием протокола на основе СТАВ-метода, разработанного В. Е. Падутовым и др. [19].

Для определения количества копий генов *CBF-A12*, *CBF-A14*, *CBF-A15* проводили мультиплексную ПЦР в реальном времени с зондами Taqman. Реакционная смесь объемом 25 мкл содержала: по 0,2 мкМ прямых и обратных праймеров для каждого целевого гена и однокопийного референсного гена *CONSTANS2* (*CO2*) [16]; по 0,1 мкМ зондов TaqMan к целевому и референсному генам; 2 ед. полимеразы с «горячим стартом»; 1× буфер для ПЦР; 2,5 мМ MgCl₂; 0,2 мМ смеси dNTP и 50 нг матричной ДНК. В данной работе использовали модифицированные версии зондов, описанных J. Zhu с соавторами [16] с иными флуорофорами и гасителями: зонд к генам *CBF* нес 5'-флуорофор FAM, а зонд к гену *CO2* — HEX; в качестве 3'-гасителя во всех зондах использовали BHQ.

Программа для амплификации: первичная денатурация препарата ДНК — 1 цикл

95 °С — 2 мин, 38 циклов — быстрая денатурация 95 °С — 15 с, отжиг праймеров Tm °С — 30 с, элонгация 67 °С — 15 с. Считывание сигнала флуоресценции проводили на этапе отжига праймеров.

Количество копий определяли по среднему коэффициенту кратного изменения между геном-мишенью и контрольным геном в четырех биологических повторах.

Результаты и обсуждение

Чувствительный и устойчивый к холоду гаплотипы (FR-A2-S и FR-A2-T соответственно) у мягкой пшеницы различаются по соотношениям числа копий *CBF-A12*, *CBF-A14* и *CBF-A15*. Так, устойчивые к низким температурам гаплотипы характеризуются повышенным количеством копий *CBF-A12* и *CBF-A14*, в то время как количество копий *CBF-A15* у них снижено. Стоит также отметить, что среди указанных генов наиболее сильную связь между чувствительностью к пониженным температурам и копийностью проявляет ген *CBF-A14*, в то время как остальные влияют на морозостойкость в меньшей степени [18]. Количество копий *CBF-A14* также варьирует в зависимости от происхождения сорта: восточноевропейские сорта характеризуются повышенным количеством копий гена, а западноевропейские наоборот — пониженным [18].

Коллекция мягкой пшеницы, а также пять яровых сортов были протипированы по генам *CBF-A12*, *CBF-A14* и *CBF-A15* локуса *Fr-A2*. Так как контрольный ген *CO2* всегда представлен в количестве одной копии на гаплоидный геном *Triticum aestivum* L., то соотношение сигналов одной копии целевого гена, расположенного в двух гаплоидных А-геномах у гексаплоидных пшениц, к сигналу контрольного гена будет приближено к 1:3. При обработке результатов ПЦР в реальном времени всю коллекцию, ввиду чувствительности метода и особенностей выборки, условно разделили на три группы по соотношению количества копий целевого гена к контрольному: образцы со значением соотношения до 0,4 были отнесены к группе с одной гаплоидной копией гена, образцы с соотношениями 0,4–0,8 — к группе с двумя гаплоидными копиями, а соотношение 0,8–1,3 — к группе с тремя гаплоидными ко-

пиями. Результаты ПЦР-анализа и количества копий протипированных образцов показаны на рисунках 1–3.

Исследуемая коллекция характеризовалась пониженным количеством копий гена *CBF-A12* — все образцы коллекции показали наличие только одной гаплоидной копии

гена, тогда как количество копий *CBF-A14* и *CBF-A15* отличалось значительной вариативностью. Так, 14 образцов, включая пять яровых сортов, показали наличие одной гаплоидной копии гена *CBF-A14*; 57 образцов имели две гаплоидные копии, и один образец 27(256/27-18) имел три гаплоидные копии

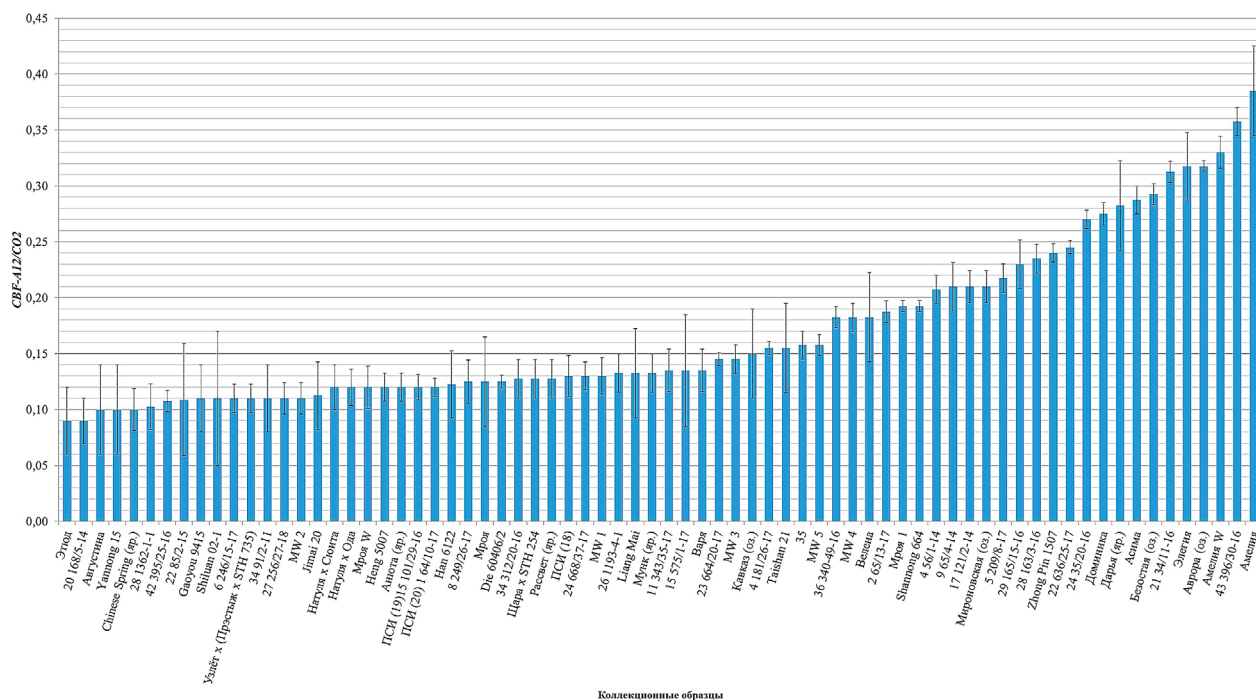


Рис. 1. Соотношение сигналов генов *CBF-A12* и *CO2* у коллекционных образцов

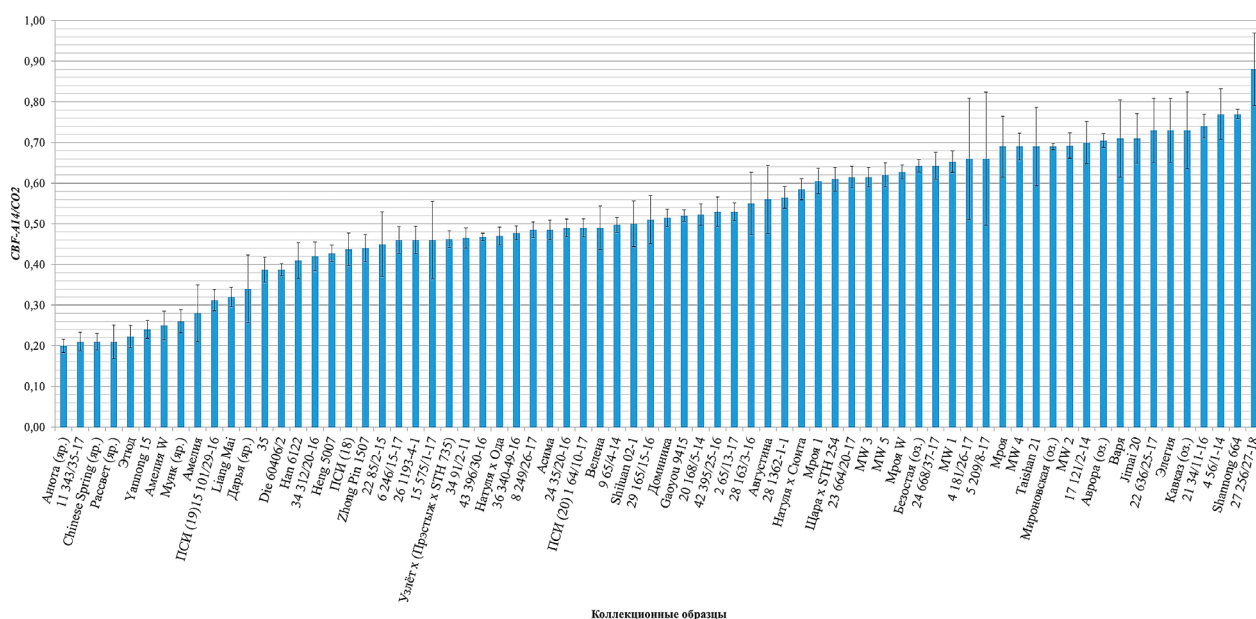


Рис. 2. Соотношение сигналов генов *CBF-A14* и *CO2* у коллекционных образцов

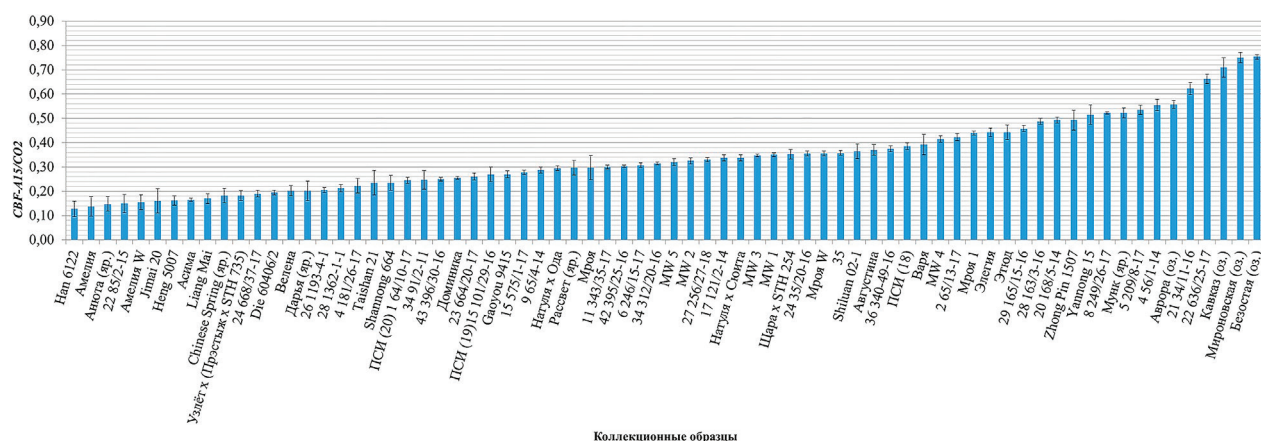


Рис. 3. Соотношение сигналов генов *CBF-A15* и *CO2* у коллекционных образцов

гена — т. е. большая часть коллекции обладала повышенным количеством копий гена *CBF-A14*. Среди образцов коллекции наблюдалось следующее варьирование количества копий гена *CBF-A15*: 52 образца, включая четыре яровых сорта, обладали одной гаплоидной копией гена; 20 образцов, включая яровой сорт Мунк, обладали двумя гаплоидными копиями гена. Таким образом, большая часть коллекции обладала пониженным количеством копий гена *CBF-A15*.

В результате молекулярно-генетического типирования из исследуемой коллекции выделили ряд образцов, показавших одновременно наличие повышенного количества копий генов *CBF-A12* и *CBF-A14* и пониженного количества копий *CBF-A15*, что соответствует устойчивому к холоду гаплотипу [16]. К сортам с заданными характеристиками количества копий исследуемых генов был отнесен 41 образец: ПСИ(18); 9(65/4-14); 17(121/2-14); 22(85/2-15); 26(1193-4-1); 28(1362-1-1); 34(91/2-11); 24(35/20-16); 34(312/20-16); 36(340-49-16); 42(395/25-16); 43(396/30-16); ПСИ(20) 1(64/10-17); 4(181/26-17); 6(246/15-17); 15(575/1-17); 23(664/20-17); 24(668/37-17); 27(256/27-18); Августина; Мроя; Велена; MW 1; MW 2; MW 3; MW 5; Доминика; Асима; Варя; Щара × STN 254; Узлёт × (Прэстыж × STN 735); Мроя W; Натуля × Сюита; Натуля × Ода; Taishan 21; Shiluan 02-1; Shannong 664; Jimai 20; Heng 5007; Han 6122 и Gaoyou 9415.

С учетом различного вклада основных генов *CBF* локуса *Fr-A2* в формирование признака морозостойкости [14], далее были выделены 11 сортов, показавших высокое содержание

гена *CBF-A14* с соотношением сигналов 0,70–0,88: Jimai 20, Аврора, Варя, 22(636/25-17), Элегия, 21(34/11-16), Shannong 664, 4(56/1-14), Кавказ и 27(256/27-18).

Стоит отметить, что у контрольных яровых сортов большая роль в развитии признаков, связанных с влиянием низких температур, отводится полиморфизмам в генах *Vrn* [15, 20], однако при типировании по генам *CBF-A12*, *CBF-A14* и *CBF-A15* они показали низкие значения всех трех исследуемых генов, что коррелирует с чувствительностью к холоду и, вероятно, указывает на влияние генов *CBF* в формировании ответа на низкотемпературный стресс, в том числе и в яровых формах.

А. N. Sieber с соавторами [18] подтвердили значимость CNV в локусе *FR-A2* для степени проявления морозостойкости на примере твердой пшеницы, где вариации числа копий гена *CBF-A14* объясняли около 90% генотипической дисперсии в *FR-A2*. В дальнейшем Т. Würschum с соавторами [14] также заявили о важности копийности *CBF-A14* для морозостойкости пшеницы.

Таким образом, CNV *CBF-A14* локуса *Fr-A2* на данный момент рассматривается в качестве основного маркера морозостойкости пшеницы. Повышенное количество копий гена *CBF-A14* является одним из показателей высокой морозостойкости растений и представляет интерес в селекции по данному признаку. Несмотря на то, что вариации копийности *CBF-A12* и *CBF-A15* меньше влияют на признак морозостойкости, другие виды полиморфизмов этих генов также могут рассматриваться в качестве маркеров для селекции сортов

с повышенной устойчивостью к пониженным температурам. Стоит отметить, что необходимо дальнейшее исследование генов *CBF* локуса *Fr-A2* по уровню экспрессии и ее связи с морозостойкостью пшеницы.

Заключение

На данный момент считается, что у озимой мягкой пшеницы в локусе *FROSTRESISTANCE 2 (FR-2)*, расположенном на длинном плече хромосомы 5A, находятся наиболее значимые QTL, связанные с признаком морозостойкости.

В результате анализа CNV генов *CBF-A12*, *CBF-A14* и *CBF-A15* локуса *Fr-A2* в коллекции сортообразцов гексаплоидной пшеницы была обнаружена вариативность числа копий генов *CBF-A14* и *CBF-A15*, в то время как ген *CBF-A12* во всех протипированных образцах был представлен одной гаплоидной копией.

Наиболее широким полиморфизмом количества копий характеризовался ген *CBF-A14*. Четырнадцать образцов, включая пять яровых сортов, показали наличие одной гаплоидной копии гена *CBF-A14*; 57 образцов имели две гаплоидные копии и один образец — три гаплоидные копии гена. При этом соотношение целевого гена к контрольному варьировало в диапазоне 0,20–0,88. Полиморфизм копийности *CBF-A15* был представлен в меньших вариациях: 52 образца, включая четыре яровых сорта, обладали одной гаплоидной копией *CBF-A15*; 20 образцов, включая яровой сорт Мунк, обладал двумя гаплоидными копиями гена, а диапазон соотношений целевого гена к контрольному находился в пределах 0,15–0,75.

По результатам типирования можно выделить 41 образец, представляющий наибольший потенциал в качестве исходного селекционного материала для создания морозостойких сортов: ПСИ(18); 9(65/4-14); 17(121/2-14); 22(85/2-15); 26(1193-4-1); 28(1362-1-1); 34(91/2-11); 24(35/20-16); 34(312/20-16); 36(340-49-16); 42(395/25-16); 43(396/30-16); ПСИ(20) 1(64/10-17); 4(181/26-17); 6(246/15-17); 15(575/1-17); 23(664/20-17); 24(668/37-17); 27(256/27-18); Августина; Мроя; Велена; MW 1; MW 2; MW 3; MW 5; Доминика; Асима; Варя; Щара × СТН 254; Узлёт × (Прэстыж × СТН 735); Мроя W; Натуля × Сюита; Натуля × Ода; Taishan 21; Shiluan 02-1; Shannong 664;

Jimai 20; Heng 5007; Nan 6122 и Gaoyou 9415. Приоритетом обладают образцы 17(121/2-14), 27(256/27-18), Элегия, Варя, Shannong 664 и Jimai 20, показавшие высокий уровень копийности *CBF-A14*. Особенно стоит выделить образец 27(256/27-18), который характеризовался наибольшим количеством копий *CBF-A14* (три гаплоидные копии). Полученные результаты используются в селекции отечественных морозостойких сортов озимой мягкой пшеницы.

Список использованных источников

1. Bechtold, U. Molecular mechanisms controlling plant growth during abiotic stress / U. Bechtold, B. Field // *Journal of Experimental Botany*. – 2018. – Vol. 69, Iss. 11. – P. 2753–2758.
2. Differentially regulated orthologs in sorghum and the subgenomes of maize / Y. Zhang, D. W. Ngu, D. Carvalho [et al.] // *Plant Cell*. – 2017. – Vol. 29. – P. 1938–1951.
3. Quantitative Trait Loci Associated with Phenological Development, Low-Temperature Tolerance, Grain Quality, and Agronomic Characters in Wheat (*Triticum aestivum* L.) / D. B. Fowler, A. N'Diaye, D. Laudencia-Chinguanco, C. J. Pozniak // *PLoS One*. – 2016. – Vol. 11, Iss. 3. – 21 p.
4. Chinnusamy, V. Cold stress regulation of gene expression in plants / V. Chinnusamy, J. Zhu, J. K. Zhu // *Trends Plant Sci*. – 2007. – Vol. 12. – P. 444–451.
5. The *cbfs* triple mutants reveal the essential functions of *CBFs* in cold acclimation and allow the definition of *CBF* regulons in *Arabidopsis* / Y. Jia, Y. Ding, Y. Shi [et al.] // *The New phytologist*. – 2016. – Vol. 212, Iss. 2. – P. 345–353.
6. ICE1: a regulator of cold-induced transcriptome and freezing tolerance in *Arabidopsis* / V. Chinnusamy, M. Ohta, S. Kanrar [et al.] // *Genes & development*. – 2003. – Vol. 17, Iss. 8. – P. 1043–1054.
7. Theocharis, A. Physiological and molecular changes in plants grown at low temperatures / A. Theocharis, C. Clément, E. A. Barka // *Planta*. – 2012. – Vol. 235, Iss. 6. – P. 1091–1105.
8. Gene Regulation and Signal Transduction in the ICE-CBF-COR Signaling Pathway during Cold Stress in Plants / D. Z. Wang, Y. N. Jin, X. H. Ding [et al.] // *Biochemistry. Biokhimiia*.

– 2017. – Vol. 82, Iss. 10. – P. 1103–1117.

9. Barrero-Gil, J. Gene Regulatory Networks Mediating Cold Acclimation: The CBF Pathway / J. Barrero-Gil, J. Salinas // *Adv Exp Med Biol.* – 2018. – Vol. 1081. – P. 3–22.

10. Guo, X. Cold signaling in plants: Insights into mechanisms and regulation / X. Guo, D. Liu, K. Chong // *Journal of integrative plant biology.* – 2018. – Vol. 60, Iss. 9. – P. 745–756.

11. MAP Kinase Cascades Regulate the Cold Response by Modulating ICE1 Protein Stability / C. Zhao, P. Wang, T. Si [et al.] // *Developmental cell.* – 2017. – Vol. 43, Iss. 5. – P. 618–629.

12. Phenylalanine ammonia-lyase activity and content of flavonoid compounds in wheat seedlings at the action of hypothermia and hydrogen sulfide donor / Y. E. Kolupaev, E. I. Horielova, T. O. Yastreb [et al.] // *Ukr. Biochem. J.* – 2018. – Vol. 90, Iss. 6. – P. 12–20.

13. Association genetics studies on frost tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.) reveal new highly conserved amino acid substitutions in *CBF-A3*, *CBF-A15*, *VRN3* and *PPD1* genes / S. Babben, E. Schliephake, P. Janitza [et al.] // *BMC Genomics.* – 2018. – Vol. 19, Iss. 409. – P. 1–2.

14. Copy number variations of *CBF* genes at the *Fr-A2* locus are essential components of winter hardiness in wheat / T. Würschum, C. F. H. Longin, V. Hahn [et al.] // *Plant J.* – 2017. – Vol. 89, Iss. 4. – P. 764–773.

15. Large deletions in the *CBF* gene cluster at

the *Fr-B2* locus are associated with reduced frost tolerance in wheat / S. Pearce, J. Zhu, Á. Boldizsár [et al.] // *Theor Appl Genet.* – 2013. – Vol. 126. – P. 2683–2697.

16. Copy number and haplotype variation at the *VRN-A1* and central *FR-A2* loci are associated with frost tolerance in hexaploid wheat / J. Zhu, S. Pearce, A. Burke [et al.] // *Theoretical and applied genetics.* – 2014. – Vol. 127, Iss. 5. – P. 1183–1197.

17. *CBF* gene copy number variation at Frost Resistance-2 is associated with levels of freezing tolerance in temperate-climate cereals / A. K. Knox, T. Dhillon, H. Cheng [et al.] // *Theoretical and applied genetics.* – 2010. – Vol. 121. – P. 21–35.

18. Copy number variation of *CBF-A14* at the *Fr-A2* locus determines frost tolerance in winter durum wheat / A. N. Sieber, C. F. H. Longin, W. L. Leiser, T. Würschum // *Theoretical and Applied Genetics.* – 2016. – Vol. 129, Iss. 6. – P. 1087–1097.

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

20. COR/LEA Proteins as Indicators of Frost Tolerance in *Triticeae*: A Comparison of Controlled versus Field Conditions / K. Kosová, M. Klíma, I. T. Prášil, P. Vítámvás // *Plants.* – 2021. – Vol. 10, Iss. 4:789. – 13 p.

T. E. Varfolomeeva, I. S. Gordey, V. S. Mandrusova, A. A. Sadovnik

MOLECULAR GENETIC STUDY OF THE *Fr-A2* LOCUS IN THE MODERN GENE POOL OF WINTER SOFT WHEAT (*TRITICUM AESTIVUM* L.) FOR FROST RESISTANCE BREEDING

State Scientific Institution

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

27 Akademicheskaya St., Minsk 220072, Republic of Belarus

e-mail: t.varfalameyeva@igc.by

The aim of the work is to analyze the main locus of frost resistance of winter soft wheat *Fr-A2* by CNV of the genes *CBF-A12*, *CBF-A14*, and *CBF-A15* in the modern gene pool of winter soft wheat and identify the most promising cultivars for frost-resistant varieties' breeding.

The object of the study included 67 samples of winter soft wheat (*Triticum aestivum* L.), as well as 5 spring varieties taken as control samples with reduced frost resistance.

A molecular genetic analysis of the breeding gene pool of winter soft wheat at the *Fr-A2* locus was performed. CNV analysis of the *CBF-A12*, *CBF-A14*, and *CBF-A15* genes at this locus showed polymorphism in the number of copies of the *CBF-A14* and *CBF-A15* genes. Fourteen samples, including 5 spring varieties, showed the presence of 1 haploid copy of the *CBF-A14* gene; and 57 samples had 2 haploid copies, and 1 sample had 3 haploid copies. Fifty-two samples, including 4 spring varieties, had 1 haploid copy of *CBF-A15*; and 20 samples, including the Munk spring variety, had 2 haploid copies of the gene. All the analysed samples showed the presence of only 1 haploid copy of the *CBF-A12* gene. According to analysis results, 41 samples were identified, representing the potential as a starting breeding material for creating varieties with increased frost resistance.

Keywords: soft wheat, low-temperature stress, winter hardiness, frost resistance, breeding, genetic markers, copy number variations, genotyping.

Дата поступления в редакцию: 05 февраля 2026 г.

Н. В. Гудная, А. Н. Мялик, Т. Г. Кулагина, В. В. Титок

ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ И СТРУКТУРА ПОПУЛЯЦИЙ РАВНОПЛОДНИКА ВАСИЛИСТНИКОВОГО (*ISOPYRUM THALICTROIDES* L.) В БЕЛАРУСИ

Государственное научное учреждение
«Центральный ботанический сад Национальной академии наук Беларуси»
Республика Беларусь, 220012, г. Минск, ул. Сурганова, 2в
e-mail: samakhvalava@cbg.org.by

Проведен сравнительный анализ генетического разнообразия и структуры 12 популяций *Isopyrum thalictroides* L. (равноплодника василистникового) с использованием iPBS-маркеров, основанных на LTR-ретротранспозонах. В результате установлено, что исследованные популяции обладают невысоким уровнем генетического разнообразия, низким потоком генов между ними и высокой степенью дифференциации. Наибольший уровень генетического разнообразия отмечен для популяции Атока ($N_a = 1,38$; $N_e = 1,24$; $H_e = 0,14$; $I = 0,21$) с территории Беловежской пуши, а наименьший — для искусственной популяции Станция Юннатов ($N_a = 1,05$; $N_e = 1,03$; $H_e = 0,02$; $I = 0,03$). Анализ AMOVA выявил, что большая часть генетического разнообразия обнаружена внутри популяций. Кластерный анализ, основанный на генетическом разнообразии Нея, показывает распределение изученных популяций на две основные группы, что частично соответствует их географическому положению и указывает на сложную историю расселения *Isopyrum thalictroides* L. у восточной границы ареала в постледниковую эпоху.

Ключевые слова: популяционная генетика, вид на границе ареала, iPBS-маркеры, родство популяций, филогеография вида.

Для цитирования: Генетическое разнообразие и структура популяций равноплодника василистникового (*Isopyrum thalictroides* L.) в Беларуси / Н. В. Гудная, А. Н. Мялик, Т. Г. Кулагина, В. В. Титок // Молекулярная и прикладная генетика: сб. науч. тр. / Ин-т генетики и цитологии НАН Беларуси; редкол.: А. В. Кильчевский (гл. ред.) [и др.]. – Минск, 2026. – Т. 40. – С. 13–24.

Введение

Для поддержания стабильности и устойчивости экосистем в будущем необходимо своевременное решение актуальных вопросов сохранения биоразнообразия. В настоящее время доказано, что ключевым элементом долгосрочного сохранения находящихся под угрозой исчезновения видов является их генетическое разнообразие [1]. Популяции с высокими показателями генетической вариабельности обычно обладают большим эволюционным потенциалом, чем обеспечивается их устойчивость при воздействии неблагоприятных факторов окружающей среды. Следовательно, популяции с более низкими значениями в изменяющихся условиях больше подвержены вымиранию [2]. Таким образом, знание генетического разнообразия и структуры популяций исчезающих видов является од-

ним из необходимых условий для разработки эффективных стратегий их сохранения.

Для получения значений генетических параметров используют различные виды молекулярных маркеров, каждый из которых имеет ряд преимуществ и недостатков, связанных с воспроизводимостью, технологическими требованиями и стоимостью. Применение iPBS-маркеров позволяет получать высоковоспроизводимые результаты с использованием простых аналитических систем и является доступным методом для исследователей всего мира [3].

Вышеизложенным определяется актуальность и цель данной работы — с использованием молекулярных iPBS-маркеров определить генетическое разнообразие, структуру и родство естественных и искусственных популяций редкого охраняемого вида флоры

Беларуси *Isopyrum thalictroides* L.

Ранее выполненные работы польских и российских коллег по изучению генетического разнообразия и полиморфизма *I. thalictroides* проводились методом электрофоретического анализа запасных белков семян и листьев для польских популяций [4], а также методом ISSR-PCR для популяций из России, Беларуси и Украины [5]. В результате этих исследований были установлены филогенетические связи между изучаемыми популяциями, однако оценка уровня генетического разнообразия и популяционная структура вида так и не были определены. Наше исследование направлено на выявление наиболее генетически гетерогенных популяций *I. thalictroides*, материал которых может быть использован для сохранения вида *ex situ*, а также на оценку распределения генетического разнообразия среди изучаемых популяций и установление их родства. Эти данные позволят идентифицировать популяции с низкой степенью генетического родства, которые требуют особого внимания при реализации природоохранных мероприятий. В частности, при проведении транслокаций и корректирующих природоохранных мероприятий данные о генетическом разнообразии и родстве имеют решающее значение [6, 7]. Заложенные ваучерные гербарные образцы помогут в будущем оценить динамику генетического разнообразия изученных популяций, т. к. отслеживание именно этого параметра, а не численности особей, позволяет гораздо раньше выявить негативные изменения, поскольку потеря разнообразия и отдельных аллелей часто предшествует исчезновению популяций [8].

Материалы и методы

Объектом исследования является *Isopyrum thalictroides* L. (равноплодник василистниковый) — многолетнее травянистое растение из семейства *Ranunculaceae* (лютиковые). Этот центральноевропейский вид в Беларуси произрастает на северо-восточной границе ареала, встречается преимущественно в старовозрастных широколиственных лесах снытевого и кисличного типа. В естественных условиях произрастает в западных районах страны, изредка культивируется как декоративное растение. Как редкий исчезающий вид включен

в Красную книгу Республики Беларусь (II категория охраны) [9].

Исходным материалом для оценки генетического разнообразия, структуры и родства популяций *I. thalictroides* послужили образцы вегетативных органов, собранные при проведении полевых флористических исследований на территории Брестского, Каменецкого, Пружанского, Волковысского и Клецкого районов. С помощью рекогносцировочных и маршрутных методов были найдены популяции данного вида, выполнена оценка их жизнеспособности, изучены морфометрические параметры, а также произведено флористическое и геоботаническое описание фитоценозов и отобран растительный материал от пяти внешне здоровых растений для молекулярно-генетических исследований. Для документирования мест сбора образцов (табл. 1) заложен гербарный материал с ваучерными этикетками (MSKH), а также созданы наблюдения в информационном ресурсе inaturalist.org, что при необходимости позволит в будущем отыскать данные популяции и провести мониторинговые исследования независимыми специалистами.

Для проведения молекулярно-генетических исследований с помощью набора для выделения «ДНК-Экстран-3» («Синтол», Россия) изолировали ДНК из предварительно высушенных в силикагеле листьев. Из популяций ЦБС (CBG), Машуки (Msh), Брест (Br), Атока (At), Тростяница (Tr), Теплухи (Tp), Перерова (Prr), Черск (Chr), Жарковщина (Zha), Семисосны (Sm), Замковый лес (Zm) брали по пять образцов, а из популяции Станция Юннатов (St) — два образца. Качество и количество выделенной ДНК проверяли с помощью NanoPhotometer Pearl (Implen GmbH, Германия). В исследовании использовали 30 iPBS-праймеров [3] (табл. 2). ПЦР проводили в 25 мкл реакционной смеси, содержащей 25–50 нг ДНК, 5 мкл готовой смеси для ПЦР ScreenMix-HS («Евроген», Россия), 1 mM праймера для 12–13 п. н. праймеров или 0,6 мкМ для 18 п. н. праймеров, и воды.

Программа ПЦР состояла из: 1 цикла при 95 °C в течение 5 мин; 35 циклов при 95 °C в течение 15 с, отжиг проводили при температуре 49,6–65,2 °C (в зависимости от праймера) в течение 60 с, элонгация при 68 °C в течение 90 с. Финальная элонгация проводилась

Таблица 1

Характеристика образцов *Isopyrum thalictroides* L.

п/п	Популяция	Местоположение	Координаты	Фитоценоз	Автор сбора и дата	Документирование
1	ЦБС (СВГ)	Минская обл., г. Минск, территория ЦБС	53.915445, 27.606777	коллекционные посадки под пологом деревьев	Мялик А.Н., Гудная Н.В., 24.05.2023	...163516205, гербарий MSKH
2	Машуки (Msh)	Минская обл., Клецкий р-н, д. Машуки, 9,5 км к юго-западу	52.840607, 26.394198	дубрава ясеневая снытевая	Мялик А.Н., Третьяков Д.И., 11.05.2023	...161816207, гербарий MSKH
3	Брест (Br)	Брестская обл., г. Брест, к востоку от Каменецкого шоссе	52.138551, 23.700701	ясеник разноотравно-снытевый	Мялик А.Н., Вахний Н.А., Третьяков Д.И., 11.05.2023	...161422692, гербарий MSKH
4	Атока (At)	Брестская обл., Каменецкий р-н, окр. д. Каленковичи, 2,6 км к северо-востоку	52.520434, 23.605614	дубрава ясеневая разноотравно-снытевая	Мялик А.Н., Третьяков Д.И., Кравчук В.В., 12.05.2023	...161423906, гербарий MSKH
5	Тростяница (Tr)	Брестская обл., Каменецкий р-н, д. Кустичи, 1,6 км к востоку-северо-востоку	52.332552, 23.584416	черноольшаник ясеневый разноотравно-снытевый	Мялик А.Н., 12.05.2023	...161431428, гербарий MSKH
6	Теплухи (Tr)	Брестская обл., Каменецкий р-н, х. Вискули, 2 км к западу	52.620268, 23.922415	дубрава грабовая разноотравная	Мялик А.Н., Третьяков Д.И., Кравчук В.В., 12.05.2023	гербарий MSKH
7	Переро (Pr)	Брестская обл., Пружанский р-н, х. Переро, 0,3 км к северу	52.649133, 23.923231	дубрава грабовая разноотравная	Мялик А.Н., 12.05.2023	...161424929
8	Черск (Chr)	Брестская обл., Брестский р-н, д. Черск, 4,3 км к северо-востоку	51.746296, 23.728330	черноольшаник ясеневый разноотравный	Мялик А.Н., 24.04.2025	...272605359, гербарий MSKH
9	Жарковщина (Zha)	Гродненская обл., Свислочский р-н, д. Жарковщина, 0,6 км к югу	52.874338, 24.078075	черноольшаник ясеневый разноотравно-снытевый	Мялик А.Н., Вабищевич М.М., 13.05.2025	...281050902, гербарий MSKH
10	Семисосны (Sm)	Брестская обл., Брестский р-н, д. Семисосны, 1 км к востоку	52.039751, 23.902611	дубрава грабовая разноотравная	Мялик А.Н., Вабищевич М.М., 24.04.2025	...272604529, гербарий MSKH
11	Замковый лес (Zm)	Гродненская обл., Волковысский р-н, д. Залешаны, 0,5 км к северу	53.187200, 24.564133	грабняк липово-снытевый	Мялик А.Н., Вабищевич М.М., 13.05.2025	...281053236, гербарий MSKH
12	Станция Юннатов (St)	Минская обл., г. Минск, ул. Макаенка, дом 8	53.924469, 27.627027	коллекционные посадки под пологом деревьев	Мялик А.Н., Третьяков Д.И., 17.05.2023	...162341459

Примечание. В графе «Документирование» указаны данные, которые записываются в конце ссылки [https://www.inaturalist.org/observations/...](https://www.inaturalist.org/observations/)

Таблица 2

Праймеры, используемые в исследовании

Праймер	Оптимальная температура отжига Ta (°C)	Последовательность (5' – 3')
2389	50,0	ACATCCTTCCCA
2373	51,0	GAACCTTGCTCCGATGCCA
2277	52,0	GGCGATGATACCA
2376	52,0	TAGATGGCACCA
2375	52,5	TCGCATCAACCA
2377	53,0	ACGAAGGGACCA
2378	53,0	GGTCCTCATCCA
2383	53,0	GCATGGCCTCCA
2374	53,5	CCCAGCAAACCA
2095	53,7	GCTCGGATACCA
2083	54,6	CTTCTAGCGCCA
2237	55,0	CCCCTACCTGGCGTGCCA
2239	55,0	ACCTAGGCTCGGATGCCA
2272	55,0	GGCTCAGATGCCA
2077	55,1	CTCACGATGCCA
2232	55,4	AGAGAGGCTCGGATACCA
2390	56,4	GCAACAACCCCA
2273	56,5	GCTCATCATGCCA
2394	56,5	GAGCCTAGGCCA
2220	57,0	ACCTGGCTCATGATGCCA
2242	57,0	GCCCCATGGTGGGCGCCA
2076	59,2	GCTCCGATGCCA
2271	60,0	GGCTCGGATGCCA
2415	61,0	CATCGTAGGTGGGCGCCA
2078	62,8	GCGGAGTCGCCA
2399	63,0	AAACTGGCAACGGCGCCA
2080	63,3	CAGACGGCGCCA
2081	65,0	GCAACGGCGCCA
2270	65,0	ACCTGGCGTGCCA
2079	65,2	AGGTGGGCGCCA

при 72 °C в течение 8 мин. Амплификацию выполняли в программируемом терморегуляторе GeneExplorer GE-48DG (Hangzhou Bioer Technology Co., Китай). Электрофорез проводили при напряжении 65 V на протяжении 5,5 ч в 2%-ом агарозном геле. Для окрашивания геля использовали бромид этидия (30 мин) и визуализировали с использованием системы UV Imager Gel Doc XR+ (Bio-Rad, США).

Для построения бинарных матриц на осно-

ве изображений электрофорезов использовалась программа PyElph 1.4. Все фрагменты ДНК, которые можно точно распознать, рассматривались как единичные доминантные локусы. Наличие или отсутствие фрагментов обозначали как «1» или «0» соответственно. Полученные данные в виде бинарной матрицы обрабатывали с помощью программы PopGene 1.31 для расчета следующих параметров: доля полиморфных локусов (P), эф-

фективное (N_e) и наблюдаемое (N_a) число аллелей, информационный индекс Шеннона (I), генетическое разнообразие Нея (H_e), общее разнообразие генов (H_t), разнообразие генов в популяциях (H_s), коэффициент генетической дифференциации ($G_{st} = [H_t - H_s] / H_t$) и поток генов среди популяций (N_m). Программный пакет GenALEX 6.5 для MS Excel использовали при расчете величины информационного полиморфизма (PIC), среднего генетического расстояния, анализа молекулярной вариации (AMOVA) и анализа главных координат (PCoA). Для построения дендрограммы методом Уорда (ward.D2) использовали пакет Stats для R.

Результаты и обсуждение

Исследованиями были равномерно охвачены естественные популяции *I. thalictroides*, находящиеся на северо-восточной границе ареала данного вида (запад Брестской и Гродненской областей), а также в островном локалитете на территории Клецкого района Минской обла-

сти (рис. 1). Поиск ранее известного места произрастания *I. thalictroides* на территории Кореличского района Гродненской области не увенчался успехом, что, возможно, свидетельствует об исчезновении вида в отмеченном локалитете. Искусственные популяции (ЦБС и Станция Юннатов) представляют собой образцы, сохраняемые в условиях *ex situ* специализированных коллекций, анализ которых поможет выяснить поддержание variability вида в условиях резервных коллекций.

Для оценки генетического разнообразия *I. thalictroides* подходящими оказались пять праймеров — 2374, 2383, 2242, 2277 и 2239, поскольку они позволили получить достаточно четкие фрагменты ДНК с полиморфными локусами. Результаты ПЦР с использованием маркера 2383 представлены на рисунке 2.

В результате градиентной ПЦР были установлены оптимальные температуры отжига подобранных праймеров (табл. 3).

Для отобранных iPBS-маркеров установлены такие показатели, как количество

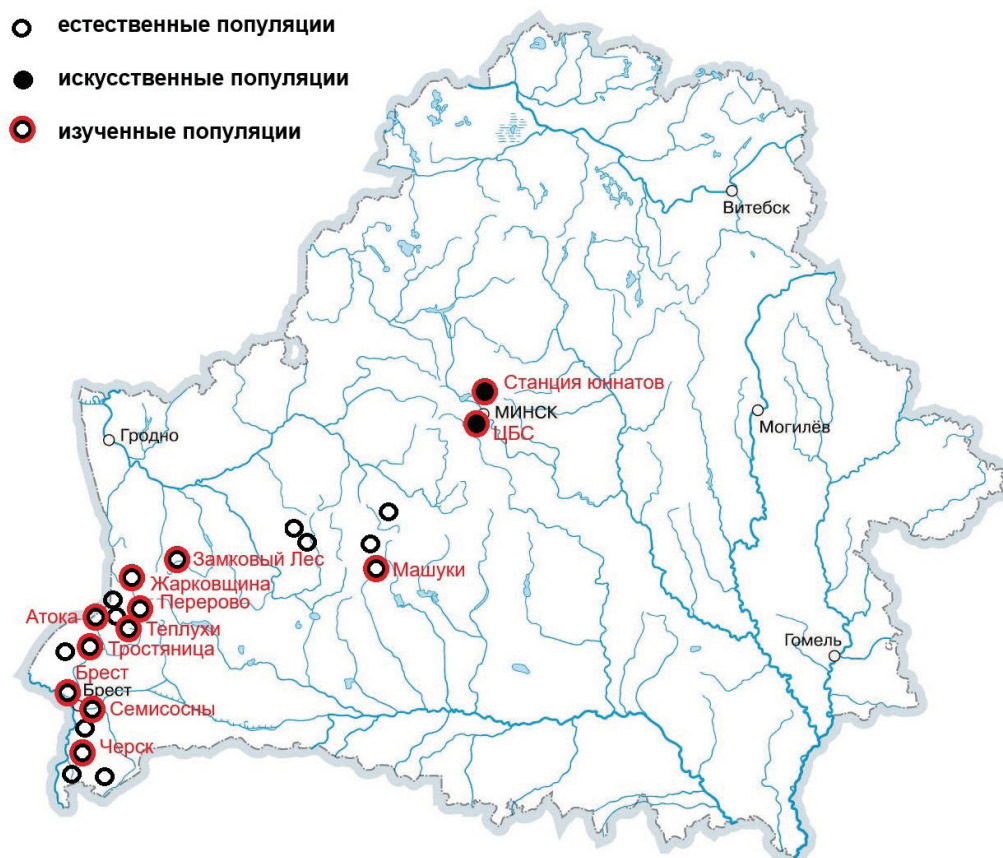


Рис. 1. Расположение исследованных популяций *Isopyrum thalictroides* L.

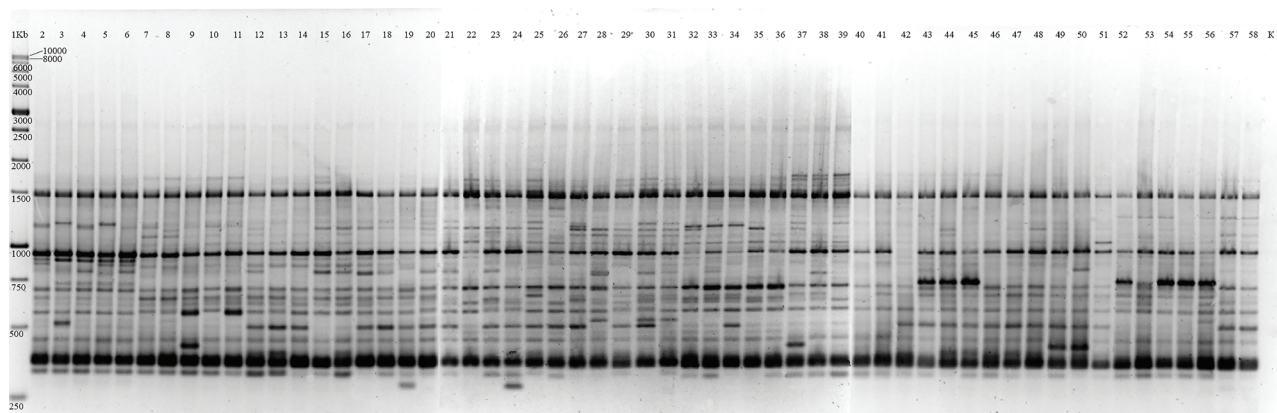


Рис. 2. Результаты ПЦР с использованием 2383 iPBS-праймера для популяций ЦБС (дорожки 2–6), Машуки (дорожки 7–11), Брест (дорожки 12–16), Атока (дорожки 17–21), Тростяница (дорожки 22–26), Теплухи (дорожки 27–31), Перерово (дорожки 32–36), Черск (дорожки 37–41), Жарковщина (дорожки 42–46), Семисосны (дорожки 47–51), Замковый лес (дорожки 52–56) и Станция Юннатов (дорожки 57–58). Первая дорожка — маркер молекулярного веса 1 Кб. Последняя дорожка — отрицательный контроль

Таблица 3

Оптимальные температуры отжига праймеров после оптимизации

Праймер	Оптимальная температура отжига, T_a (°C)	Последовательность (5' – 3')
2374	53,0	CCCAGCAAACCA
2383	53,0	GCATGGCCTCCA
2242	58,0	GCCCCATGGTGGGCGCCA
2277	51,0	GGCGATGATACCA
2239	55,0	ACCTAGGCTCGGATGCCA

полиморфных локусов, их доля и мера информационного полиморфизма (PIC) (табл. 4).

Для подобранных праймеров всего было получено 259 локусов, из которых полиморфными являются 252, что составляет 97,30%. Максимальное значение меры информационного полиморфизма (PIC) получено для маркера 2242 (0,32), а минимальное — для маркера

2383 (0,23), что позволяет использовать данные маркеры для оценки генетических параметров изучаемого вида.

При анализе для каждой популяции были рассчитаны: доля полиморфных ампликонов (P), эффективное (N_e) и наблюдаемое (N_a) число аллелей, информационный индекс Шеннона (I), генное разнообразие Нея (H_e). Для

Таблица 4

Характеристика отобранных iPBS-маркеров

Праймер	Количество локусов	Количество полиморфных локусов	Доля полиморфных локусов, %	Мера информационного полиморфизма (PIC)
2374	56	55	98,21	0,26
2383	38	35	92,11	0,23
2242	57	55	96,50	0,32
2277	52	52	100,00	0,26
2239	56	55	98,21	0,27

всех локусов 12 изученных популяций также были рассчитаны общее генетическое разнообразие (Ht), генетическое разнообразие в популяциях (Hs), уровень подразделенности популяций (Gst) и поток генов между ними (Nm) (табл. 5).

Таблица 5

Параметры генетического разнообразия исследованных популяций *Isopyrum thalictroides* L.

Параметр	Модельная популяция												Для всех популяций
	CBG	Msh	Br	At	Tr	Tr	Prr	Chr	Zha	Sm	Zm	St	
P (%)	25,87	30,50	28,96	37,45	37,84	33,96	33,20	35,91	33,20	27,80	28,19	4,63	92,11
Na	1,26 ± 0,03	1,31 ± 0,03	1,29 ± 0,03	1,38 ± 0,03	1,38 ± 0,03	1,34 ± 0,03	1,33 ± 0,03	1,36 ± 0,03	1,33 ± 0,03	1,28 ± 0,03	1,28 ± 0,03	1,05 ± 0,01	1,97 ± 0,01
Ne	1,19 ± 0,02	1,18 ± 0,02	1,19 ± 0,02	1,24 ± 0,02	1,23 ± 0,02	1,23 ± 0,02	1,21 ± 0,02	1,23 ± 0,02	1,22 ± 0,02	1,17 ± 0,02	1,18 ± 0,02	1,03 ± 0,01	1,40 ± 0,02
He	0,10 ± 0,01	0,12 ± 0,01	0,11 ± 0,01	0,14 ± 0,01	0,13 ± 0,01	0,13 ± 0,01	0,12 ± 0,01	0,13 ± 0,01	0,13 ± 0,01	0,10 ± 0,01	0,10 ± 0,01	0,02 ± 0,01	0,25 ± 0,01
I	0,15 ± 0,02	0,16 ± 0,02	0,16 ± 0,02	0,21 ± 0,02	0,20 ± 0,02	0,19 ± 0,02	0,18 ± 0,02	0,20 ± 0,02	0,19 ± 0,02	0,15 ± 0,02	0,15 ± 0,02	0,03 ± 0,01	0,39 ± 0,01
Ht	—												0,25 ± 0,002
Hs	—												0,11 ± 0,0005
Gst	—												0,56
Nm	—												0,39

В результате выявлено, что наибольшая доля полиморфных локусов обнаружена для популяций Атока (At), Тростяница (Tr) и Черск (Chr) — 37,45; 37,84 и 35,91% соответственно. Искусственная популяция Станция Юннатов (St) обладает наименьшей долей полиморфных локусов (4,63%). Максимальные значения наблюдаемого числа аллелей (Na) также определены для популяций Атока (At) и Тростяница (Tr) — 1,38, а наименьшее — для популяции Станция Юннатов (St) — 1,05. Показатели эффективного числа аллелей варьировались от 1,03 до 1,24 у всех изученных популяций, что указывает на их низкое генетическое разнообразие. Полученные значения He и I для популяции Атока (At) (0,14 и 0,21 соответственно), а также самые высокие значения Na и Ne подтверждают, что эта попу-

ляция характеризуется наибольшим уровнем генетического разнообразия среди всех исследованных выборок. Наименьшим уровнем генетического разнообразия ожидаемо обладает популяция Станция Юннатов (St) со значениями He и I — 0,02 и 0,03 соответственно. Такие низкие показатели разнообразия объясняются как малым количеством отобранных образцов из данной популяции (2 пробы), так и близким родством проанализированных особей, представляющих собой вегетативно размноженные растения. При этом искусственная популяция ЦБС имеет показатели генетического разнообразия сопоставимые с естественными, поскольку ее формирование осуществлялось путем переноса растений в виде семян.

Для всех локусов изученных популяций были получены значения Na, Ne, He, I и доля по-

лиморфных локусов, которые составили 1,97; 1,40; 0,25; 0,39 и 92,11% соответственно. Показатель популяционной структуры ($G_{st} > 0,25$) подтверждает довольно сильную их дифференциацию [10]. В целом для всех изученных популяций можно отметить низкие значения генетического разнообразия и высокий уровень генетической дифференциации, которые могут быть обусловлены главным образом генетическим дрейфом и естественным отбором. Генетический дрейф изменяет распределение генетической изменчивости либо за счет снижения внутривнутрипопуляционной изменчивости, либо за счет усиления межпопуляционной дифференциации [11].

Согласно С. Райту [12], интенсивность потока генов можно разделить на три уровня N_m : $\geq 1,0$ (сильный), 0,250–0,99 (средний) и $< 0,249$ (низкий). Значение N_m в нашем исследовании указывает на средний уровень потока генов, следовательно, генетический дрейф является одной из основных причин генетической диф-

ференциации изученных популяций. Относительно низкий уровень потока генов может быть обусловлен также тем, что *I. thalictroides*, вероятно, в условиях Беларуси размножается преимущественно вегетативным способом и, являясь барохором, обладает низкой подвижностью диаспор.

В результате АМОВА выявлено, что большая доля изменчивости обнаруживается внутри популяций (54%). Разница между индивидами в популяциях была статистически значимой ($P < 0,001$). Полученное значение $\Phi_{iPT} = 0,460$ подтверждает результаты расчета G_{st} и указывает на довольно высокий уровень генетической дифференциации среди популяций *I. thalictroides* (табл. 6). Обнаруженное преобладание внутривнутрипопуляционного разнообразия указывает на возможность эффективного применения природоохранных мероприятий для меньшего числа популяций, т. к. они содержат большую часть существующей изменчивости [13].

Таблица 6

Результаты АМОВА для популяций *Isopyrum thalictroides* L.

Источник изменчивости	Число степеней свободы (df)	Сумма квадратов (SS)	Средний квадрат (MS)	Дисперсия	Φ_{iPT}	Доля в вариации
Общее	56	2012,46	–	37,13	0,460*	–
Между популяциями	11	1110,46	100,95	17,08		0,46
Внутри популяций	45	902,00	20,044	20,04		0,54

Примечание. * — различия достоверны при уровне значимости $P < 0,001$

Для установления филогеографических связей между популяциями *I. thalictroides* у восточной границы ареала на территории Беларуси была составлена матрица парных генетических сходств и расстояний Нея (табл. 7).

Наибольшее генетическое расстояние (0,32) наблюдается между популяциями ЦБС (СВГ) и Станция Юннатов (St), что объясняется их различным происхождением. Так, растения из популяции ЦБС (СВГ) происходят из естественных мест произрастания *I. thalictroides* на территории Беларуси, а растения из популяции Станция Юннатов (St) были привезены в прошлом из окрестностей города

Моршин (Украинские Карпаты). Показатель генетического расстояния Нея между наиболее родственными популяциями Черск (Chr) и Жарковщина (Zha) составил всего 0,09. Данная особенность не соответствует географическому положению отмеченных популяций, расстояние между которыми превышает 120 км.

Результаты кластерного анализа, проведенного методом Уорда (ward.D2) на основании данных матрицы расстояний Нея, показаны на рисунке 3 и также демонстрируют некоторые особенности родства изученных популяций.

Представленные данные показывают, что

Таблица 7
 Матрица парных генетических сходств (над диагональю) и расстояний Нея
 (под диагональю)

Популяция	CBG	Msh	Br	At	Tr	Тр	Prr	Chr	Zha	Sm	Zm	St
CBG	–	0,82	0,83	0,82	0,80	0,79	0,77	0,79	0,78	0,77	0,76	0,73
Msh	0,20	–	0,90	0,86	0,83	0,82	0,80	0,83	0,82	0,79	0,78	0,75
Br	0,19	0,10	–	0,89	0,85	0,87	0,83	0,85	0,84	0,81	0,80	0,76
At	0,20	0,15	0,12	–	0,89	0,87	0,85	0,85	0,85	0,86	0,83	0,78
Tr	0,22	0,19	0,17	0,11	–	0,90	0,88	0,85	0,84	0,83	0,81	0,76
Тр	0,24	0,19	0,14	0,14	0,10	–	0,90	0,87	0,87	0,83	0,82	0,76
Prr	0,27	0,22	0,18	0,16	0,13	0,10	–	0,89	0,88	0,83	0,81	0,77
Chr	0,23	0,18	0,17	0,16	0,17	0,14	0,12	–	0,91	0,85	0,86	0,80
Zha	0,25	0,20	0,18	0,16	0,17	0,14	0,13	0,09	–	0,89	0,89	0,81
Sm	0,27	0,23	0,21	0,15	0,19	0,18	0,18	0,16	0,12	–	0,89	0,84
Zm	0,28	0,25	0,22	0,19	0,21	0,20	0,21	0,16	0,12	0,12	–	0,86
St	0,32	0,29	0,27	0,25	0,28	0,27	0,26	0,23	0,21	0,18	0,15	–

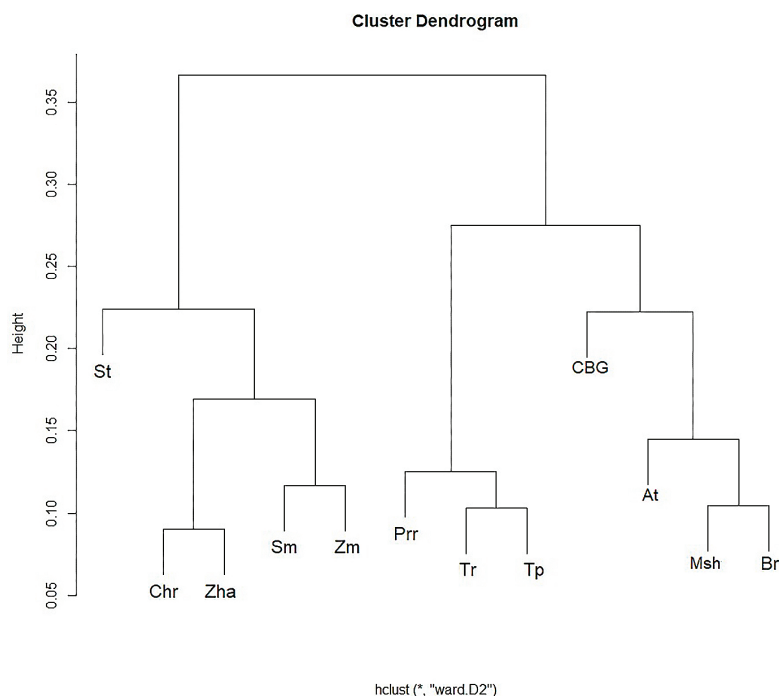


Рис. 3. Дендрограмма на основе генетического расстояния Нея, показывающая взаимосвязь между изученными популяциями *Isopyrum thalictroides* L.

подразделение популяций на кластеры и подкластеры лишь частично согласуется с их географическим расположением на территории Беларуси. Вполне объяснимо, что популяции Перерово (Prr), Тростяница (Tr) и Теплухи (Tp) находятся в одном подкластере, что соответствует их расположению в южной части Беловежской пуши. Естественные популяции Жарковщина (Zha), Черск (Chr), Семисосны (Sm) и Замковый лес (Zm) находятся в одном кластере с искусственной популяцией Станция Юннатов (St), что может указывать на их генетическую связь с Украинскими Карпатами. В то же время в отдельный кластер выделяются относительно близко расположенные популяции Атока (At), Тростяница (Tr), Теплухи (Tp), Брест (Br) и Перерово (Prr), к которым тяготеет островная популяция Машуки (Msh) и ЦБС (CBG). С учетом того, что последняя из них также происходит из островного локалитета *I. thalictroides* (Кореличский район), можно предположить их общий генезис, связанный

с центральноевропейским фрагментом ареала изучаемого вида.

Распределение популяций на графике главных координат (рис. 4) соответствует кластерному анализу. Популяции ЦБС (CBG), Машуки (Msh), Брест (Br), Атока (At), Тростяница (Tr) и Теплухи (Tp) находятся в левых квадрантах, а популяции Семисосны (Sm), Замковый лес (Zm), Жарковщина (Zha), Черск (Chr), Станция Юннатов (St) и популяция Перерово (Prr), которая на графике ближе всего к популяции Теплухи (Tp), расположены в правых квадрантах. С помощью анализа РСоА выявлено, что на первые три компоненты главных координат приходится 43,69% всей вариации, что указывает на отсутствие четких генетических кластеров и предполагает влияние множества факторов на дифференциацию популяций *I. thalictroides*.

Одной из возможных причин отсутствия четкой связи между географическим положением популяций и генетическим расстоя-

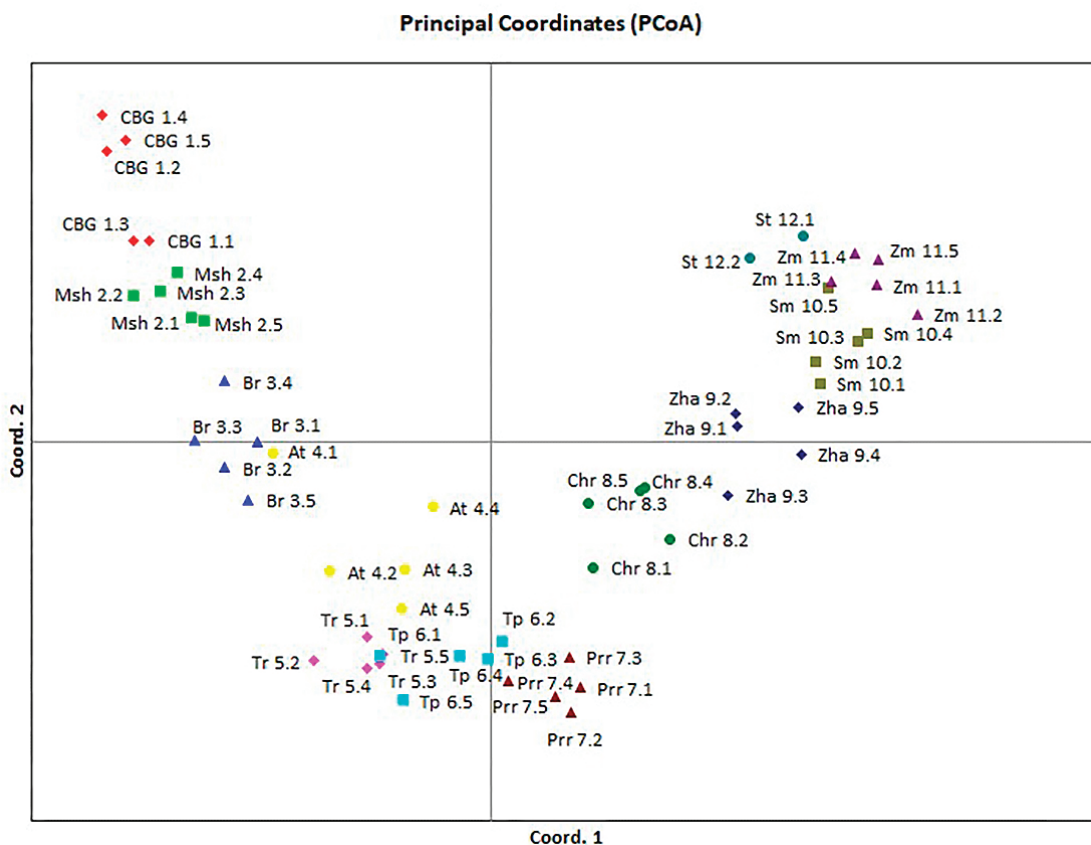


Рис. 4. Распределение исследованных образцов *Isopyrum thalictroides* L. на первых двух главных координатах (PCoA)

нием Нея в нашем исследовании является то, что различия популяций *I. thalictroides* определяются также генетическим дрейфом или условиями окружающей среды, а не только географическим расстоянием. Низкое значение Nm и высокие показатели PhiPT и Gst подтверждают это предположение. Сходные выводы были получены при генетико-популяционной оценке *Chorisia speciosa* St. Hil [14] и *Calanthe tsoongiana* T. Tang et F. T. Wang [15].

Заключение

В результате проведенных исследований с помощью iPBS-маркеров выполнена генетико-популяционная оценка 10 естественных популяций *Isoopyrum thalictroides* L., находящихся в Беларуси на северо-восточной границе ареала данного вида и в островном локалитете. Установлено, что все изученные популяции характеризуются относительно низким уровнем генетического разнообразия, подтверждающим высокую уязвимость вида. Анализ искусственных популяций показывает возможность успешного сохранения генетической изменчивости в условиях *ex situ* специализированных коллекций при правильном методическом подходе их формирования. Низкий уровень потока генов ($Nm = 0,39$) подтверждает сильное влияние генетического дрейфа на формирование генетической дифференциации между популяциями. По результатам анализа AMOVA установлено, что большая часть генетического разнообразия находится внутри популяций, что указывает на возможность охраны небольшого числа популяций для сохранности генофонда вида. Результаты кластерного анализа показывают распределение изученных популяций на две основные группы, что частично соответствует их географическому положению и свидетельствует о сложной истории расселения *Isoopyrum thalictroides* L. на восточной границе ареала.

Список использованных источников

1. Begna, T. Role of plant genetic diversity conservation and utilization / T. Begna // International Journal of Novel Research in Life Sciences. – 2022. – Vol. 9, Iss. 1. – P. 1–11.
2. Current progress and future prospects for understanding genetic diversity of seed plants in China / Y. Xiong, Y. Zhao, Y. He [et al.] // Biological Diversity. – 2024. – Vol. 1, Iss. 1. – P. 13–21.
3. IPBS: a universal method for DNA fingerprinting and retrotransposon isolation / R. Kalendar, K. Antonius, P. Smykal [et al.] // Theor. Appl. Genet. – 2010. – Vol. 121, № 8. – P. 1419–1430.
4. Skrajna, T. Morphological and genetic diversity of *Isoopyrum thalictroides* L. (*Ranunculaceae*) populations of isolated forest fragments of different sizes in East Central Poland / T. Skrajna, H. Kubicka, M. Ługowska // Polish Journal of Ecology. – 2015. – Vol. 63, № 1. – P. 23–37.
5. Молекулярно-генетическое исследование образцов растений редкого в России вида *Isoopyrum thalictroides* L. (*Ranunculaceae*) для изучения полиморфизма его популяций / Е. В. Немцова, В. В. Телеганова, Ю. А. Семенищенков [и др.] // Вестник Тверского гос. ун-та. Серия: Биология и экология. – 2023. – № 3. – С. 35–45.
6. Albrecht, M. A. Genetic monitoring to assess the success of restoring rare plant populations with mixed gene pools / M. A. Albrecht, C. E. Edwards // Mol. Ecol. – 2020. – Vol. 29, № 21. – P. 4037–4039.
7. The importance of genetic diversity for the translocation of eight threatened plant species into the wild / D. Schäfer, H. Vincent, M. Fischer, A. Kempel // Global Ecology and Conservation. – 2020. – Vol. 24. – doi: 10.1016/j.gecco.2020.e01240.
8. Monitoring biodiversity in the global change era: The importance of herbaria and genetic diversity / M. Viveiros-Moniz, A. García-Muñoz, L. Matias [et. al.] // Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics. – 2025. – Vol. 67. – doi: 10.1016/j.ppees.2025.125862.
9. Красная книга Республики Беларусь. Растения: редкие и находящиеся под угрозой исчезновения виды дикорастущих растений / редкол.: С. М. Масляк (предс.) [и др.]. – 5-е изд. – Мн. : Беларусь, 2025. – 576 с.
10. Hartl, D. L. Principles of Population Genetics, 4th Edition / D. L. Hartl, A. G. Clark. – New York : Oxford University Press, 2007. – 672 p.
11. Falk, D. A. Genetics and Conservation of Rare Plants / D. A. Falk, K. A. Holsinger. – New York : Oxford University Press, 1991. – 283 p.
12. Wright, S. Evolution and the Genetics of Populations. IV. Variability Within and Among Natural Populations / S. Wright. – Chicago : University of Chicago Press, 1978. – 590 p.

13. Genetic Diversity and Population Structure of the Rare and Endangered Plant Species *Pulsatilla patens* (L.) Mill in East Central Europe / M. Szczecińska, G. Sramko, K. Wołosz, J. Sawicki // PLoS One. – 2016. – Vol. 11, № 3. – doi: 10.1371/journal.pone.0151730
14. Souza, L. M. F. I. Genetic structure in fragmented populations of *Chorisia speciosa* St. Hil / L. M. F. I. Souza, P. Y. Kageyama, A. M. Sebbenn // *Scientia forestalis*. – 2004. – Vol. 65. – P. 70–79.
15. Qian, X. Genetic Diversity and Population Differentiation of *Calanthe tsoongiana*, a Rare and Endemic Orchid in China / X. Qian, W. Cai-xia, M. Tian // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2013. – Vol. 14, № 10. – P. 20 399–20 413.

N. V. Hudnaya, A. N. Mialik, T. G. Kulahina, V. V. Titok

GENETIC DIVERSITY AND STRUCTURE OF POPULATIONS OF *ISOPYRUM THALICTROIDES* L. IN BELARUS

State Scientific Institution

“Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus”

2v Surganov St., Minsk 220012, Republic of Belarus

e-mail: samakhvalava@cbg.org.by

A comparative analysis of the genetic diversity and structure of 12 *Isopyrum thalictroides* L. populations was conducted using iPBS markers based on LTR retrotransposons. It was found that the studied populations have a low level of genetic diversity, low gene flow between them, and a high degree of differentiation. The highest level of genetic diversity was observed in the Atoka population ($N_a = 1.38$, $N_e = 1.24$, $H_e = 0.14$, $I = 0.21$) from the territory of Belovezhskaya Pushcha, and the lowest level — in the artificial population at the Yunnatov Station ($N_a = 1.05$, $N_e = 1.03$, $H_e = 0.02$, $I = 0.03$). AMOVA analysis revealed that the highest genetic diversity was found within populations. Cluster analysis based on Nei's genetic diversity shows the distribution of the studied populations into two main clusters, which partly corresponds to their geographical location and indicates a complex history of the dispersal of *Isopyrum thalictroides* L. at the eastern border of the range in the postglacial era.

Keywords: population genetics, species at the range boundary, iPBS-markers, population relationships, species phylogeography.

Дата поступления в редакцию: 17 декабря 2025 г.

N. Y. Dostanko¹, V. E. Yagur¹, E. S. Siniauskaya², R. I. Goncharova²

GENETIC POLYMORPHISMS *STAT4* RS7574865, *PTPN2* RS2542151 AND *AGER* RS1035798 IN BELARUSIAN PATIENTS WITH SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS

¹Educational Institution

“Belarusian State Medical University”

83 Dzerzhinsky Ave., Minsk 220083, Republic of Belarus

²State Scientific Institution

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

27 Akademicheskaya St., Minsk 220072, Republic of Belarus

e-mail: r.goncharova@igc.by

This study assessed *STAT4* rs7574865, *PTPN2* rs2542151, and *AGER* rs1035798 polymorphisms in systemic lupus erythematosus (SLE) susceptibility in the Belarusian population. We analyzed 408 individuals (63 SLE patients and 345 healthy controls) using real-time PCR with TaqMan probes. The *STAT4* minor T allele was significantly more frequent in SLE patients (OR = 1.78, p = 0.006), with TT genotype carriers showing 1.9- to 4.39-fold increased SLE risk under log-additive and recessive models. The *AGER* minor A allele and the AA genotype demonstrated protective effects (OR = 0.51, p = 0.003). *PTPN2* rs2542151 showed nearly two-fold increased risk for GT heterozygotes under the overdominant model. Co-carriage of *STAT4* T, *AGER* G, and *PTPN2* T alleles resulted in three-fold increased SLE susceptibility. Our findings confirm the adverse role of *STAT4* rs7574865 and the protective role of *AGER* rs1035798 in SLE development, highlighting complex gene interactions in SLE susceptibility.

Keywords: systemic lupus erythematosus, *STAT4*, rs7574865, *PTPN2*, rs2542151, *AGER*, rs1035798.

To quote: Genetic polymorphisms *STAT4* rs7574865, *PTPN2* rs2542151 and *AGER* rs1035798 in Belarusian patients with systemic lupus erythematosus / N. Y. Dostanko, V. E. Yagur, E. S. Siniauskaya, R. I. Goncharova // Молекулярная и прикладная генетика: сб. науч. тр. / Ин-т генетики и цитологии НАН Беларуси; редкол.: А. В. Кильчевский (гл. ред.) [и др.]. – Минск, 2026. – Т. 40. – С. 25–37.

Introduction

A thorough analysis of the currently available published data on a genetic predisposition to systemic lupus erythematosus (SLE) drew our attention to several genetic polymorphisms identified as factors increasing the risk of a wide range of autoimmune diseases. After a preliminary assessment of some of these polymorphism frequencies in SLE patients in the Belarusian population [1, 2, 3], we identified several genes relevant to SLE in our population, including key regulatory genes such as *STAT4*, *PTPN2*, and *AGER*.

The *STAT4* gene located on chromosome 2q32.2 is a member of the STAT family of proteins that transduce signals from various cytokines and are key transcriptional activators of hundreds of genes associated with immune cell survival,

proliferation, and differentiation. Regulation of *STAT4* gene expression plays a crucial role in the immune response. Specifically, this protein is essential for the development of follicular T-helper lymphocytes, promotes the differentiation of T-helper 1 (Th1) cells, participates in the differentiation of regulatory T-lymphocytes (Treg), inhibits the development of T-helper 17 (Th17) progenitor cells, activates natural killer (NK) cells, and contributes to the formation of memory NK cells. Thus, its function in the immune system encompasses both innate and adaptive immune responses. Single nucleotide polymorphisms in the *STAT4* gene are associated with various autoimmune diseases, including rheumatoid arthritis (RA), systemic lupus erythematosus (SLE), and lupus nephritis. [4] *STAT4* and its interaction with IL-12 play an

important role in the pathogenesis of autoimmune diseases. Elevated levels of IL-12 and *STAT4* protein correlate with the activity and severity of SLE and promote the formation of autoantibodies in SLE. [5] Several meta-analyses have shown that the T allele or the TT genotype of the *STAT4* rs7574865 polymorphism is a SLE risk factor in the individuals of Asian, European, and American descent, despite differences in prevalence rates across different ethnic groups. [6, 7] Nevertheless, an association between the specific alleles of the *STAT4* rs7574865 polymorphism and the risk of SLE, according to some published studies, remains controversial [8].

The *PTPN2* gene is located on chromosome 18 and encodes the protein tyrosine phosphatase non-receptor type 2, which is expressed in macrophages, T lymphocytes, dendritic cells, intestinal epithelial cells, and acts as a negative regulator of inflammatory processes, restraining or preventing the development of inflammation and promoting immunological tolerance. The *PTPN2* gene regulates several key signaling pathways, including JAK/STAT, MAPK, and NF- κ B, which play an important role in inflammation and cell proliferation, differentiation and survival. Deletion or partial ablation of *PTPN2* led to hyperactivation of these pathways, which contributed to an enhanced inflammatory response, spontaneous, chronic, and autoimmune inflammation. [9, 10] Furthermore, *PTPN2* regulates interactions between macrophages and intestinal epithelial cells by modulating the production of cytokines and chemokines that affect epithelial cell barrier function, including tight junction integrity and epithelial permeability. *PTPN2* deletion and inactivation resulted in impaired interactions between macrophages and epithelial cells, immune hyperactivation, an increased expression of proinflammatory cytokines and chemokines such as IL-6 and TNF- α and an exacerbated inflammatory response. [10, 11] Polymorphisms in the *PTPN2* gene, as well as modulation of its activity in experimental studies, were associated with the development of various autoimmune diseases, including rheumatoid arthritis. The *PTPN2* gene is a susceptibility locus for RA in Europeans. A reduced expression of this gene in RA affected a large number of proinflammatory cytokines (IL-6, TNF- α), including increased IL-6 levels. [10, 12, 13]

AGER is the gene that encodes the RAGE receptor on the cell surface. This gene is located on the short arm of chromosome 6 at position 6p21.3. This locus is also the site of major histocompatibility complex III and is involved in inflammatory and immunological responses. The gene is polymorphic; approximately 20 polymorphisms have been described. Polymorphisms in the *AGER* gene have been shown to be associated with the risk of SLE, RA, and Sjögren's syndrome. [14, 15] The rs1035798 polymorphism in the third intron of the *AGER* gene is among the few markers in the major histocompatibility complex (MHC) class III region identified in genome-wide association studies as associated with the risk of developing ACCP-positive rheumatoid arthritis, in addition to the DRB1 region.[16]

In this regard, we considered it relevant to assess the contribution of genetic polymorphisms *STAT4* rs7574865, *PTPN2* rs2542151 and *AGER* rs1035798 to SLE susceptibility in the Belarusian population.

Materials and Methods

Genetic material analysis for the studied polymorphisms was performed at the Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus within the framework of the Scientific and Technical Program of the Union State "DNA Identification," Section 6.4 "Molecular Genetic Assessment of Autoimmune Disease Risk." Genetic material samples were collected at Minsk Scientific and Practical Center for Surgery, Transplantology, and Hematology (MSPC STH), with approval from the MSPC-STH Ethics Committee. The procedures performed in the study complied with the ethical standards of the Institutional Research Ethics Committee, the Helsinki Declaration, and its subsequent amendments. All participants included in this study provided written informed voluntary consent. Blood samples were collected and clinical and laboratory examination data were obtained from SLE patients undergoing treatment at the Rheumatology Department (the study group) and from healthy donors attending the MSPC-STH (the control group). All patients included in the study met the American College of Rheumatology classification criteria for Systemic Lupus Erythematosus (1997 ACR criteria).

DNA was extracted from peripheral blood samples using the phenol-chloroform method. The allelic status of the *STAT4* gene for the rs7574865 polymorphism, the *PTPN2* gene for the rs2542151 polymorphism, and the *AGER* gene for the rs1035798 polymorphism was determined by real-time PCR using TaqMan fluorescent-labeled probes. CFX Maestro software version 1.0 (Bio-Rad) was used for results' analysis and genotype identification. Statistical data processing was performed using Statistica 10.0 and SNPStats web tool software packages. Data analysis included descriptive statistics for genotypes and alleles. Compliance of genotype distribution with the Hardy-Weinberg equilibrium was assessed using the Fisher's exact test; the Mann-Whitney U test, the Pearson's χ^2 test and the two-tailed Fisher's exact test were used to assess the significance of differences between the groups. Prognostic odds ratios (OR), positive (LR+) and negative (LR-) likelihood ratios with corresponding 95% confidence intervals (95% CI) were calculated to assess the significance of tests for prediction. To evaluate the prognostic significance of allelic status for the studied polymorphism under different inheritance models (codominant, dominant, recessive, overdominant, and log-additive), prognostic odds ratios (OR) with 95% confidence intervals (95% CI), as well as Akaike (AIC) and Bayesian (BIC) information criteria for each model, were calculated.

Results and Discussion

The study included 408 individuals aged from 18 to 72 years, with the mean age of 38.2 years (95% CI 37.2–39.3 years), the median age of

37.4 years, and 25–75th percentile covering the age range 29.7–47.3 (Shapiro-Wilk test 0.978, $p < 0.001$), including 316 women and 92 men. The SLE patient group comprised 63 individuals, including 59 women and 4 men aged from 18 to 72 years (the mean age of 38.9 years, 95% CI 35.7–42.1 years, the median age of 37.1 years), the control group consisted of 345 individuals, including 257 women and 88 men aged from 18 to 63 years (the mean age 38.1 of years, 95% CI 37–39.2 years, the median age of 37.5 years). No significant differences in age were detected between the study and control groups (Mann-Whitney U test, $p = 0.98$); however, sex differences between the study and control groups were significant (6.3% and 25.5% men in the SLE and control groups respectively (Fisher's exact test, $p < 0.001$). Therefore, subsequent calculations were sex-adjusted.

Analysis of compliance of genotype distribution for the studied *STAT4*, *PTPN2* and *AGER* gene polymorphisms with the Hardy-Weinberg equilibrium revealed no significant deviations in the SLE group, the control group, or the overall sample (corresponding values for *STAT4*: $p_{\text{SLE}} = 0.58$, $p_{\text{control}} = 0.063$ and $p_{\text{overall}} = 0.28$, $n = 407$; for *PTPN2*: $p_{\text{SLE}} = 0.26$, $p_{\text{control}} = 0.84$ and $p_{\text{overall}} = 0.72$, $n = 406$; and for *AGER*: $p_{\text{SLE}} = 1.0$, $p_{\text{control}} = 0.42$, and $p_{\text{overall}} = 0.39$, $n = 405$).

The distribution of allele frequencies for the G and T alleles of the *STAT4* gene, the G and T alleles of the *PTPN2* gene, and the G and A alleles of the *AGER* gene in the overall sample, the SLE group, and the control group is presented in Table 1.

The minor polymorphic T allele of the *STAT4*

Table 1
Allele frequencies of the *STAT4*, *PTPN2*, and *AGER* genes in the study groups

Gene	Allele	All subjects		Control group		SLE group	
		n	Allele frequency	n	Allele frequency	n	Allele frequency
<i>STAT4</i>	G	618	0.76	536	0.78	82	0.66
	T	196	0.24	154	0.22	42	0.34*
<i>PTPN2</i>	T	675	0.83	580	0.84	95	0.78
	G	137	0.17	110	0.16	27	0.22
<i>AGER</i>	G	520	0.64	427	0.62	93	0.76
	A	290	0.36	261	0.38	29	0.24*

Note. * — significant differences between the groups

gene was significantly more frequent in SLE patients compared to the control group (the Pearson's χ^2 test = 7.673, $p = 0.006$; the Fisher's exact test $p = 0.008$). The prognostic odds ratio (OR), the positive likelihood ratio (LR+), and the negative likelihood ratio (LR-) for the minor T allele of the rs7574865 polymorphism in relation to the SLE risk were 1.78 (95% CI 1.18–2.69); 1.52 (95% CI 1.13–1.99); and 0.85 (95% CI 0.74–0.96), respectively. The distribution of G and T allele frequencies of the *PTPN2* gene in the SLE and control groups did not differ significantly (the Pearson's χ^2 test = 2.831, $p = 0.092$; the Fisher's exact test $p = 0.115$). The minor polymorphic A allele was less frequent in SLE patients

than in the control group; the difference was also statistically significant (the Pearson's χ^2 test = 9.047, $p = 0.003$; the Fisher's exact test $p = 0.003$). The prognostic odds ratio (pOR), the positive likelihood ratio (LR+), and the negative likelihood ratio (LR-) for the minor A allele of the rs1035798 polymorphism in relation to SLE risk were 0.51 (95% CI 0.33–0.79), 0.63 (95% CI 0.45–0.86), and 1.23 (95% CI 1.08–1.36), respectively.

The genotype frequency distribution of the studied gene polymorphisms in the SLE group, the control group, and the overall sample is presented in Table 2.

Since the expected number of *STAT4* TT

Table 2

Genotype frequencies of the *STAT4*, *PTPN2*, and *AGER* genes in the study groups (n = 408)

Gene	Genotype	All subjects		Control group		SLE group	
		n	Genotype frequency	n	Genotype frequency	n	Genotype frequency
<i>STAT4</i>	G/G	230	0.57	202	0.59	28	0.45
	G/T	158	0.39	132	0.38	26	0.42
	T/T	19	0.05	11	0.03	8	0.13
	NA	1	–	0	–	1	–
<i>PTPN2</i>	T/T	279	0.69	244	0.71	35	0.57
	T/G	117	0.29	92	0.27	25	0.41
	G/G	10	0.02	9	0.03	1	0.02
	NA	2	–	0	–	2	–
<i>AGER</i>	G/G	171	0.42	136	0.4	35	0.57
	G/A	178	0.44	155	0.45	23	0.38
	A/A	56	0.14	53	0.15	3	0.05
	NA	3	–	1	–	2	–

Note. NA — genotype not determined; n — number of identified genotypes in the study group

genotype carriers and *PTPN2* GG genotype carriers in the SLE group was less than 5 (2.89 and 1.5, respectively), only the Fisher's exact test was used to analyze differences in *STAT4* and *PTPN2* genotype distribution between the study groups. The minor TT genotype of the *STAT4* gene was significantly more frequent in the SLE group than in the control group ($p = 0.004$), suggesting an increased risk of SLE development in its carriers, whereas the increased frequency of the TG heterozygote and the TT homozygote

of the *PTPN2* gene among SLE patients did not reach statistical significance ($p = 0.065$ and $p = 0.051$, respectively). The AA genotype of the *AGER* gene was significantly more frequent in the control group compared to the SLE group (the χ^2 test = 8.67, $df = 2$, $p = 0.013$; the Fisher's exact test $p = 0.011$), suggesting a protective effect of its carriage against SLE risk. Cramér's V values for the analysis of *STAT4*, *PTPN2*, and *AGER* genotype differences were 0.175, 0.113, and 0.146, respectively, corresponding to a small effect size.

For all studied gene polymorphisms, odds ratios for SLE development were calculated for each genotype under different inheritance models along with the corresponding AIC and BIC information criteria and p-values. The analysis results are

presented in Tables 3 and 4.

The genotype frequency data and calculated OR, AIC, and BIC values indicate that significant differences in the genotype frequencies of the *STAT4* polymorphic gene were detected between

Table 3
SLE risk associated with the *STAT4* gene rs7574865 polymorphism under different inheritance models without sex adjustment (n = 407)

Inheritance model	Genotype	Control group	SLE group	OR (95% CI)	p	AIC	BIC
Codominant	G/G	202 (58.5%)	28 (45.2%)	1.00	0.007	343.5	355.6
	G/T	132 (38.3%)	26 (41.9%)	1.42 (0.80–2.53)			
	T/T	11 (3.2%)	8 (12.9%)	5.25* (1.94–14.16)			
Dominant	G/G	202 (58.5%)	28 (45.2%)	1.00	0.051	347.6	355.6
	G/T–T/T	143 (41.5%)	34 (54.8%)	1.72 (1.00–2.96)			
Recessive	G/G–G/T	334 (96.8%)	54 (87.1%)	1.00	0.004	343	351
	T/T	11 (3.2%)	8 (12.9%)	4.50* (1.73–11.69)			
Overdominant	G/G–T/T	213 (61.7%)	36 (58.1%)	1.00	0.59	351.1	359.1
	G/T	132 (38.3%)	26 (41.9%)	1.17 (0.67–2.02)			
Log-additive	–	–	–	1.87* (1.21–2.90)	0.005	343.6	351.6

Note. * — significant differences between the groups

Table 4
SLE risk associated with the *STAT4* gene rs7574865 polymorphism under different inheritance models with sex adjustment (n = 407)

Inheritance model	Genotype	Control group	SLE group	OR (95% CI)	p	AIC	BIC
Codominant	G/G	202 (58.5%)	28 (45.2%)	1.00	0.008	332.2	348.2
	G/T	132 (38.3%)	26 (41.9%)	1.48 (0.83–2.66)			
	T/T	11 (3.2%)	8 (12.9%)	5.21* (1.88–14.42)			

End of the Table 4

Inheritance model	Genotype	Control group	SLE group	OR (95% CI)	p	AIC	BIC
Dominant	G/G	202 (58.5%)	28 (45.2%)	1.00	0.04	335.6	347.6
	G/T–T/T	143 (41.5%)	34 (54.8%)	1.78* (1.03–3.10)			
Recessive	G/G–G/T	334 (96.8%)	54 (87.1%)	1.00	0.005	331.9	343.9
	T/T	11 (3.2%)	8 (12.9%)	4.39* (1.65–11.71)			
Overdominant	G/G–T/T	213 (61.7%)	36 (58.1%)	1.00	0.49	339.3	351.3
	G/T	132 (38.3%)	26 (41.9%)	1.22 (0.70–2.12)			
Log-additive	–	–	–	1.90* (1.22–2.96)	0.005	331.8	343.8

Note. * — significant differences between the groups

the SLE and control groups for three inheritance models (codominant, recessive, and log-additive), and for four models (codominant, dominant, recessive, and log-additive) when sex-adjusted and confirm the adverse effect of *STAT4* TT genotype carriage on SLE risk. The recessive and log-additive models had the best, stable, and nearly equal predictive value for SLE risk (AIC and BIC values for these models were virtually identical regardless of sex adjustment), but demonstrated different odds ratios of 4.5 without sex adjustment (4.39 with adjustment) for the

recessive inheritance model and 1.87 without sex adjustment (1.9 with adjustment) for the log-additive model.

The genotype frequencies of the *PTPN2* polymorphic gene for rs2542151 in the SLE and control groups of the overall sample, odds ratio values for SLE presence, corresponding p-values, and calculated AIC and BIC information criteria for different inheritance models are presented in Tables 5 and 6.

The analysis data indicate that significant differences in the genotype frequencies of the

Table 5
SLE risk associated with the *PTPN2* gene polymorphic allele carriage under different inheritance models without sex adjustment (n = 406)

Inheritance model	Genotype	Control group	SLE group	OR (95% CI)	p	AIC	BIC
Codominant	T/T	244 (70.7%)	35 (57.4%)	1.00	0.084	344.6	356.6
	G/T	92 (26.7%)	25 (41%)	1.89 (1.08–3.34)			
	G/G	9 (2.6%)	1 (1.6%)	0.77 (0.10–6.30)			

End of the Table 5

Inheritance model	Genotype	Control group	SLE group	OR (95% CI)	p	AIC	BIC
Dominant	T/T	244 (70.7%)	35 (57.4%)	1.00	0.042	343.5	351.5
	G/T-G/G	101 (29.3%)	26 (42.6%)	1.79 (1.03–3.14)*			
Recessive	T/T-G/T	336 (97.4%)	60 (98.4%)	1.00	0.64	347.4	355.4
	G/G	9 (2.6%)	1 (1.6%)	0.62 (0.08–5.00)			
Overdominant	T/T-G/G	253 (73.3%)	36 (59%)	1.00	0.027	342.7	350.7
	G/T	92 (26.7%)	25 (41%)	1.91 (1.09–3.35)*			
Log-additive	–	–	–	1.52 (0.94–2.47)	0.097	344.8	352.8

Note. * — significant differences between the groups

Table 6

SLE risk associated with the *PTPN2* gene polymorphic allele carriage under different inheritance models with sex adjustment (n = 406)

Inheritance model	Genotype	Control group	SLE group	OR (95% CI)	p	AIC	BIC
Codominant	T/T	244 (70.7%)	35 (57.4%)	1.0	0.1	333.8	349.9
	G/T	92 (26.7%)	25 (41%)	1.88 (1.06–3.35)			
	G/G	9 (2.6%)	1 (1.6%)	1.08 (0.13–9.23)			
Dominant	T/T	244 (70.7%)	35 (57.4%)	1.0	0.039	332.1	344.1
	G/T-G/G	101 (29.3%)	26 (42.6%)	1.83 (1.04–3.23)*			
Recessive	T/T-G/T	336 (97.4%)	60 (98.4%)	1.0	0.9	336.4	348.4
	G/G	9 (2.6%)	1 (1.6%)	0.87 (0.10–7.34)			
Overdominant	T/T-G/G	253 (73.3%)	36 (59%)	1.0	0.033	331.8	343.9
	G/T	92 (26.7%)	25 (41%)	1.88 (1.06–3.33)*			
Log-additive	–	–	–	1.62 (0.98–2.68)	0.067	333	345

Note. * — significant differences between the groups

PTPN2 gene were detected between the SLE and control groups for the dominant and overdominant inheritance models, with the overdominant model consistently showing the best AIC and BIC values for predicting SLE susceptibility in our sample regardless of sex adjustment.

The genotype frequencies of the *AGER* gene in the SLE and control groups, odds ratio values for SLE presence, corresponding p-values, and AIC and BIC information criteria for different inheritance models are presented in Tables 7 and 8.

Table 7

Associations of *AGER* gene genotypes with SLE risk under different inheritance models without sex adjustment (n = 405)

Inheritance model	Genotype	Control group	SLE group	OR (95% CI)	p	AIC	BIC
Codominant	G/G	136 (39.5%)	35 (57.4%)	1.0	0.027	295.9	307.1
	G/A	155 (45.1%)	23 (37.7%)	0.58 (0.32–1.02)			
	A/A	53 (15.4%)	3 (4.9%)	0.22* (0.06–0.75)			
Dominant	G/G	136 (39.5%)	35 (57.4%)	1.0	0.022	295.8	303.3
	G/A–A/A	208 (60.5%)	26 (42.6%)	0.49* (0.28–0.84)			
Recessive	G/G–G/A	291 (84.6%)	58 (95.1%)	1.0	0.04	296.9	304.4
	A/A	53 (15.4%)	3 (4.9%)	0.28* (0.09–0.94)			
Overdominant	G/G–A/A	189 (54.9%)	38 (62.3%)	1.0	0.3	300	307.5
	G/A	155 (45.1%)	23 (37.7%)	0.74 (0.42–1.29)			
Log-additive	–	–	–	0.52* (0.33–0.81)	0.008	294	301.5

Note. * — significant differences between the groups

Table 8

Associations of *AGER* gene genotypes with SLE risk under different inheritance models with sex adjustment (n = 405)

Inheritance model	Genotype	Control group	SLE group	OR (95% CI)	p	AIC	BIC
Codominant	G/G	136 (39.5%)	35 (57.4%)	1.0	0.012	329.1	345.1
	G/A	155 (45.1%)	23 (37.7%)	0.57 (0.32–1.02)			
	A/A	53 (15.4%)	3 (4.9%)	0.23* (0.07–0.79)			

End of the Table 8

Inheritance model	Genotype	Control group	SLE group	OR (95% CI)	p	AIC	BIC
Dominant	G/G	136 (39.5%)	35 (57.4%)	1.0	0.011	329.5	341.5
	G/A–A/A	208 (60.5%)	26 (42.6%)	0.49* (0.28–0.85)			
Recessive	G/G–G/A	291 (84.6%)	58 (95.1%)	1.0	0.022	330.7	342.7
	A/A	53 (15.4%)	3 (4.9%)	0.30* (0.09–0.99)			
Overdominant	G/G–A/A	189 (54.9%)	38 (62.3%)	1.0	0.25	334.7	346.7
	G/A	155 (45.1%)	23 (37.7%)	0.72 (0.41–1.27)			
Log-additive	–	–	–	0.52* (0.33–0.82)	0.003	327.3	339.3

Note. * — significant differences between the groups

The analysis data indicate that significant differences in genotypes between the SLE and control groups were detected for the codominant, dominant, recessive, and log-additive inheritance models regardless of sex adjustment, with the log-additive inheritance model demonstrating the best metrics for predicting SLE susceptibility. Moreover, analysis of the inheritance models of the *AGER* gene genotype suggests a protective

role of the minor A allele and the AA genotype for the rs1035798 polymorphism against SLE risk.

We also analyzed the co-occurrence frequency of alleles for the studied *STAT4*, *PTPN2*, and *AGER* gene polymorphisms and the odds ratios for SLE presence for their possible combinations (Tables 9 and 10).

Analysis of the co-carriage of the *STAT4* risk T allele with the non-protective G allele of

Table 9

Frequencies of *STAT4*, *PTPN2*, and *AGER* gene allele combinations in the study sample (n = 408)

<i>STAT4</i>	<i>PTPN2</i>	<i>AGER</i>	Total frequency	Control group	SLE group	Cumulative frequency
G	T	G	0.4069	0.4182	0.3607	0.4069
G	T	A	0.234	0.2474	0.1206	0.6409
T	T	G	0.1226	0.101	0.2392	0.7635
G	G	G	0.081	0.0745	0.1205	0.8445
T	T	A	0.0678	0.074	0.0578	0.9123
G	G	A	0.0373	0.0367	0.0597	0.9496
T	G	G	0.0315	0.0268	0.0415	0.981
T	G	A	0.019	0.0214	0	1

Table 10

Association of *STAT4*, *PTPN2*, and *AGER* gene allele combinations with SLE
(n = 408, sex-adjusted)

<i>STAT4</i>	<i>PTPN2</i>	<i>AGER</i>	Frequency	OR (95% CI)	P-value
G	T	G	0.4046	1.00	–
G	T	A	0.2336	0.57 (0.26–1.26)	0.17
T	T	G	0.1249	3.02 (1.50–6.07)*	0.002
G	G	G	0.0835	2.61 (1.03–6.63)*	0.045
T	T	A	0.0677	1.21 (0.36–4.06)	0.76
G	G	A	0.0373	1.86 (0.48–7.19)	0.37
T	G	G	0.0293	1.70 (0.32–9.11)	0.54
T	G	A	0.019	0.00 (–Inf–Inf)	1

Note. * — significant differences between the groups

the *AGER* gene and the T allele of the *PTPN2* gene showed an expected three-fold increase in SLE susceptibility in the studied population. A 2.61-fold increase in SLE susceptibility was also detected for carriers of the non-protective G allele of the *AGER* gene in combination with the G allele of the *PTPN2* gene and the G allele of the *STAT4* gene, which may emphasize the complex nature of gene polymorphism interactions in their co-occurrence and the important influence of the *AGER* gene.

Conclusion

Thus, the conducted analysis suggests an increased risk of SLE development in carriers of the minor T allele of the *STAT4* gene and demonstrates a 1.9- to 4.39-fold increased risk for carriers of the *STAT4* TT genotype, with the log-additive and recessive inheritance models for the rs7574865 polymorphism being the most accurate for predicting SLE risk. The results obtained in our study of the Belarusian population are consistent with previously published works [4; 6; 7; 17], which also demonstrated the role of the rs7574865 *STAT4* TT risk genotype carriage in SLE development, as well as in some other

autoimmune diseases. [18; 19]

Analysis of genotype inheritance models for the *PTPN2* gene revealed an almost two-fold increase in SLE risk for the rs2542151 polymorphism in GT genotype carriers under the most accurate overdominant inheritance model. The detection of overdominance may indicate that heterozygotes may have a certain advantage in the studied population, possibly a more active response to infections. The results obtained in our study are in agreement with previously published data, which also reported the role of the rs2542151 polymorphism in autoimmune disease development. [10]

Furthermore, our data indicate a protective role of the A allele and the AA genotype of the *AGER* rs1035798 polymorphism against SLE risk in the Belarusian population. These findings align with the previously published data demonstrating a protective effect of the rs1035798 polymorphism in patients with another systemic autoimmune disease — rheumatoid arthritis. [20]

Additionally, our analysis revealed a three-fold increase in SLE risk in the studied population with the co-carriage of the *STAT4* risk T allele with the non-protective G allele of the *AGER* gene and the

T allele of *PTPN2*. A 2.61-fold increased risk was also detected for the co-carriage of the *STAT4* G, *AGER* G, and *PTPN2* G alleles.

*This work was supported by the Scientific and Technical Program of the Union State “DNA Identification,” Section 6.4 “Molecular Genetic Assessment of Autoimmune Disease Risk,” and genotype identification was performed at the Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus. The authors gratefully acknowledge Ivan Bakutenko for developing methodology for the *AGER* gene polymorphism determination.*

References

1. Association of *STAT4* rs7574865, *RUNX1* rs9979383, *IL6* rs1800795, *IL6R* rs2228145, *IL6R* rs4845618 with Systemic Lupus Erythematosus susceptibility and some lupus manifestations in Belarusian population / N. Dostanko, V. Yagur, R. Goncharova [et al.] // *Annals of the Rheumatic Disease*. – 2021. – Vol. 80, S. 1. – P. 1039–1040. – doi: 10.1136/annrheumdis-2021-eular.2523.
2. Association of some non-HLA gene polymorphisms with susceptibility to Systemic Lupus Erythematosus in women in Belarusian population / N. Dostanko, V. Yagur, R. Goncharova [et al.] // *Annals of the Rheumatic Disease*. – 2022. – Vol. 81, S. 1. – P. 1140–1041. – doi: 10.1136/annrheumdis-2022-eular.3090.
3. Polymorphism of some JAK-STAT pathway genes and its regulators in patients with Systemic Lupus Erythematosus and lupus nephritis in Republic of Belarus / N. Nikitchenko, H. Yatskiu, E. Siniauskaya [et al.] // *Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*. – 2023. – Vol. 67, № 3. – P. 222–230. – doi: 10.29235/1561-8323-2023-67-3-222-230.
4. *STAT4* gene polymorphisms in human diseases / Y. Xia, Y. Xie, H. Zhang [et al.] // *Front. Immunol.* – 2024. – Vol. 15. – 1479418. – URL: <https://www.frontiersin.org/journals/immunology/articles/10.3389/fimmu.2024.1479418/full> (date of access: 01.02.2026).
5. Ueno, H. The IL-12-*STAT4* axis in the pathogenesis of human systemic lupus erythematosus / H. Ueno // *Eur. J. Immunol.* – 2020. – Vol. 50, № 1. – P. 10–16.
6. Wang, J. M. Association of *STAT4* gene rs7574865, rs10168266 polymorphisms and systemic lupus erythematosus susceptibility: A meta-analysis / J. M. Wang, W. D. Xu, an-F. Huang // *Immunological Investigations*. – 2021. – Vol. 50, № 2–3. – P. 282–294.
7. Polymorphism in *STAT4* increase the risk of systemic lupus erythematosus: An updated meta-analysis / Shancui-Zheng, Jinping-Zhang, Guoyuan-Lu [et al.] // *Int. J. Rheumatol.* – 2022:5565057. – URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9054488/> (date of access: 01.02.2026).
8. Association of rs7574865 G/T polymorphism of *STAT4* gene with juvenile onset of systemic lupus erythematosus / M. Y. Krylov, M. I. Kaleda, I. A. Guseva [et al.] // *Sovremennaya Revmatologiya = Modern Rheumatology Journal*. – 2022. – Vol. 16, № 1. – P. 68–72. – doi: 10.14412/1996-7012-2022-1-68-72.
9. *PTPN2* in the Immunity and Tumor Immunotherapy: A Concise Review / J. Song, J. Lan, J. Tang, N. Luo // *Int. J. Mol. Sci.* – 2022. – Vol. 23, № 17. – P. 10025.
10. Characterization of *PTPN2* and its use as a biomarker / S. Bussi eres-Marmen, A. P. Hutchins, A. Schirbel [et al.] // *Methods*. – 2014. – Vol. 65, № 2. – P. 239–246.
11. Genetic susceptibility of increased intestinal permeability is associated with progressive liver disease and diabetes in patients with non-alcoholic fatty liver disease / L. Miele, V. Giorgio, A. Liguori [et al.] // *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* – 2020. – Vol. 30, № 11. – P. 2103–2110.
12. Aradi, B. Protein tyrosine phosphatase non-receptor type 2: an important regulator of Interleukin-6 production in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts / B. Aradi, M. Kato, M. Filkova // *Arthritis Rheumatol.* – 2015. – Vol. 67, № 10. – P. 2624–2633.
13. Polymorphisms in *STAT4*, *PTPN2*, *PSORSIC1* and *TRAF3IP2* Genes Are Associated with the Response to TNF Inhibitors in Patients with Rheumatoid Arthritis / P. Conigliaro, C. Ciccacci, C. Politi [et al.] // *PLoS One*. – 2017. – Vol. 12, № 1. – e0169956.
14. The Potential Influence of Advanced Glycation End Products and (s)RAGE in Rheumatic Diseases / C. Delrue, R. Speeckaert, J. R. Delanghe, M. M. Speeckaert // *Int. J. Mol. Sci.* – 2023. – Vol. 24, № 3. – P. 2894.
15. Advanced Glycation End-Products (AGEs) and Their Soluble Receptor (sRAGE) in Women

- Suffering from Systemic Lupus Erythematosus (SLE) / A. Nowak, B. Przywara-Chowaniec, A. Damasiewicz-Bodzek [et al.] // *Cells*. – 2021. – Vol. 10, № 12. – P. 3523.
16. Pathological Implications of Receptor for Advanced Glycation End-Product (AGER) Gene Polymorphism / M. Serveaux-Dancer, M. Jabaudon, I. Creveaux [et al.] // *Dis. Markers*. – 2019. – doi: 10.1155/2019/2067353.
17. Down-regulation-resistant *STAT4* risk haplotype contributes to lupus nephritis through CD4+ T cell interferon- γ production / I. K. Madera-Salcedo, A. L. Ramírez-Sánchez, N. Rodríguez-Rodríguez [et al.] // *Arthritis Rheumatol*. – 2023. – Vol. 75, № 6. – P. 961–972.
18. Genetic variants of predisposition to Rheumatoid Arthritis in Belarusian population / E. Siniuskaya, H. Yatskiu, N. Dostanko [et al.] // *Ann. Rheum. Dis*. – Vol. 81, Supl. 1. – P. 1143. – doi: 10.1136/annrheumdis-2022-eular.4519.
19. Polymorphisms rs7574865 and rs8211236 of *STAT4* gene are associated with various autoimmune diseases in children and adults in Belarusian population / N. V. Nikitchenko, E. S. Siniuskaya, V. E. Yagur [et al.] // IV Int. Scient. Conf. “Genetics and Biotechnology of the XXI Century: Problems, Achievements, and Prospects”, Minsk, Nov., 3–4th 2020. – Minsk, 2020. – P. 130 – URL: https://www.researchgate.net/publication/399826527_Polimorfizmy_RS7574865_i_RS_8211236_gena_STAT4_associirovany_s_razlicnymi_autoimmunnymi_zabolevaniami_detej_i_vzroslyh_belorussoj_populacii (date of access: 01.02.2026).
20. Several regions in the major histocompatibility complex confer risk for anti-CCP-antibody positive rheumatoid arthritis, independent of the DRB1 locus / H.S. Lee, A. T. Lee, L. A. Criswell [et al.] // *Mol. Med*. – 2008. – Vol. 14, № 5–6. – P. 293–300.

Н. Ю. Достанко¹, В. Е. Ягур¹, Е. С. Синявская², Р. И. Гончарова²

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ПОЛИМОРФИЗМЫ *STAT4* RS7574865, *PTPN2* RS2542151 И *AGER* RS1035798 У БЕЛОРУССКИХ ПАЦИЕНТОВ С СИСТЕМНОЙ КРАСНОЙ ВОЛЧАНКОЙ

¹Учреждение образования

«Белорусский государственный медицинский университет»
Республика Беларусь, 220083, г. Минск, пр. Дзержинского, 83

²Государственное научное учреждение

«Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси»

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

e-mail: r.goncharova@igc.by

В данном исследовании оценивали вклад полиморфизмов *STAT4* rs7574865, *PTPN2* rs2542151 и *AGER* rs1035798 в предрасположенность к системной красной волчанке (СКВ) в белорусской популяции. Проанализировано 408 человек (63 пациента с СКВ и 345 здоровых доноров) методом ПЦР в реальном времени с использованием зондов TaqMan. Минорный аллель *T* гена *STAT4* значимо чаще встречался у пациентов с СКВ (ОШ = 1,78, $p = 0,006$), при этом носители генотипа *TT* демонстрировали увеличение риска СКВ в 1,9 и 4,39 раза в лог-аддитивной и рецессивной моделях наследования. Минорный аллель *A* и генотип *AA* гена *AGER* продемонстрировали защитный эффект (ОШ = 0,51, $p = 0,003$). Полиморфизм rs2542151 гена *PTPN2* показал почти двукратное увеличение риска для гетерозигот *GT* в рамках сверждоминантной модели. Совместное носительство аллелей *T* гена *STAT4*, *G* гена *AGER* и *T* гена *PTPN2* приводило к трехкратному увеличению предрасположенности к СКВ. Полученные результаты подтверждают неблагоприятную роль полиморфизма rs7574865 гена *STAT4* и защитную роль полиморфизма rs1035798 гена *AGER* в развитии СКВ, демонстрируя сложный характер межгенных взаимодействий в предрасположенности к СКВ.

Keywords: системная красная волчанка, *STAT4*, rs7574865, *PTPN2*, rs2542151, *AGER*, rs1035798.

Дата поступления в редакцию: 11 февраля 2026 г.

M. E. Nikiforov¹, E. E. Kheidorova², M. V. Tarantovich¹, K. V. Homel¹

TAXONOMIC DIVISION OF THE COMMON KINGFISHER *ALCEDO ATTHIS* (LINNAEUS, 1758) IN BELARUS IN COMPARISON WITH THE GENETIC STRUCTURE OF THE SPECIES IN THE PALEARCTIC AREA

¹State Research and Production Association

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

27 Akademicheskaya St., Minsk 220072, Republic of Belarus

²Belarusian State Medical University

83 Dzerzhinski Ave., Minsk 220083, Republic of Belarus

e-mail: hejkatm@gmail.com

Mitochondrial *COI* gene region nucleotide sequences were used to assess the genetic structure and phylogeography of *Alcedo atthis* in the Palearctic area. The analysis of the geographic confinement of the kingfisher ancestral haplotypes showed a significant association of Hap1 with the *bengalensis* subspecies area (the Far East and Japan), and Hap3 and Hap5 — with the distribution of *ispida* and *atthis* forms (the European part of the Palearctic), respectively. Statistically significant ($P \leq 0.01$) genetic differentiation was revealed only between the kingfisher populations in the Far Eastern and Western Palearctic parts of the area due to which the kingfisher populations in the *atthis* and *ispida* subspecies areas can be considered as a genetically uniform population of the species. The Belarusian kingfisher population is part of the genetically unified Western Palearctic population despite the prevalence of the *ispida* morphological form in Belarus (67.3%) and the presence of the previously described integration zone of the areas of two European subspecies there.

Keywords: kingfisher, *Alcedo atthis*, *COI*, subspecies, geographical variation, phylogeography, taxonomic differentiation.

To quote: Taxonomic division of the common kingfisher *Alcedo atthis* (Linnaeus, 1758) in Belarus in comparison with the genetic structure of the species in the Palearctic area / M. E. Nikiforov, E. E. Kheidorova, M. V. Tarantovich, K. V. Homel // Молекулярная и прикладная генетика: сб. науч. тр. / Ин-т генетики и цитологии НАН Беларуси; редкол.: А. В. Кильчевский (гл. ред.) [и др.]. – Минск, 2026. – Т. 40. – С. 38–52.

Introduction

The common kingfisher *Alcedo atthis* (Linnaeus, 1758) is one of three bird species of the order Coraciiformes that are distributed in the temperate zone, while the habitats of most representatives of this order are the tropics and subtropics. The species is included in the IUCN Red List (2016) as Least Concern (LC), as well as in the Red Data Books of the Baltic countries, Belarus and a number of regions of European Russia.

The breeding area of the common kingfisher in Eurasia extends from the British Isles and the Atlantic coast of Europe to the Far East, Japan and New Guinea. There are 7 to 9 known subspecies of the common kingfisher, which differ slightly in size and coloration. Three subspecies live in Europe and Northern Asia: *Alcedo atthis ispida*

(Linnaeus, 1758), *A. a. atthis* (Linnaeus, 1758) and *A. a. bengalensis* (J. F. Gmelin, 1788) (Fig. 1).

The configuration of the dividing line of *A. a. atthis* and *A. a. ispida* subspecies areas is still not clear enough that can be illustrated by the example of Belarus, where the integration zone of subspecies areas presumably passes [2]. The eastern boundary of the *ispida* subspecies area was drawn along the northwest of the country [3]. However, ornithologists who studied the kingfisher collection material from the territories located further east — Brest, Minsk and even Gomel regions [4–7] also identified them as *ispida*. In a review of literary data and collection materials, V. V. Grichik [8] indicates that *ispida* is distributed in the western part of Belarus, and the populations from Gomel and Mogilev

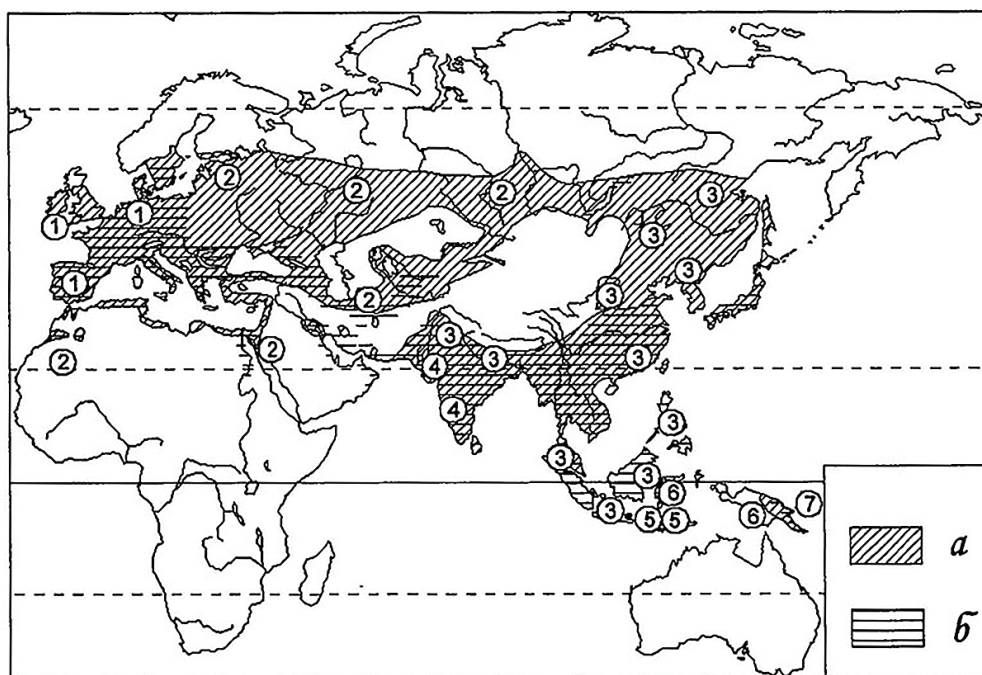


Fig. 1. The habitat area of the common kingfisher *Alcedo atthis* (Linnaeus, 1758) in Eurasia [1]. Areas: a — the breeding area, b — the wintering area; subspecies: 1 — *A. a. ispida*, 2 — *A. a. atthis*, 3 — *A. a. bengalensis*, 4 — *A. a. taprobana*, 5 — *A. a. floresiana*, 6 — *A. a. hispidoides*, 7 — *A. a. salomonensis*

regions relate to another subspecies — *atthis*. The author also suggests that the zone of the possible contact of the two subspecies above should pass to the east of Minsk in the meridional direction. Subsequently, the author presented an analysis result on the collection kingfisher specimens from Brest (12 specimens), Minsk (1 specimen), Gomel (2 specimens), and Mogilev (1 specimen) regions of Belarus stored in the funds of the zoological museums of the Belarusian State University (Belarus) and Moscow State University (Russia). Among them, only the specimen from Mogilev region was identified as *atthis*, and all the others corresponded to *ispida*.

Due to a significant overlap of morphological parameters, the assignment of specimens to *ispida* or *atthis* is not always simple and requires a deeper analysis at the gene level, which will clarify the differentiation of the species within an extensive area, as well as the possible interaction of the distinguished subspecies in the zone of their intergradation. The goal of our work is to clarify the nature of the intraspecific differentiation of the kingfisher in the contact zone of the distinguished subspecies areas in Belarus in comparison with the phylogeographic structure of the species within Northern Eurasia using DNA analysis.

Determining the taxonomic status of a subspecies or a population with independent evolutionary trends is important for the targeted conservation of endangered species.

Materials and Methods

The collection of material for morphological and genetic studies was carried out throughout the territory of Belarus by catching nesting birds with a mist net. To determine the subspecies affiliation, measurements of the length of the wing and the beak (from the anterior edge of the nostril) were used, which correlated with the geographic variability data presented in Table 1.

For further DNA analysis, 16 kingfisher biomaterial samples (No. 1–16) were collected in Belarus. The biomaterial was obtained by collecting 1–2 non-molted feathers and/or a drop of blood through a catheter. The samples from the territory of Russia (21 samples, No. 17–37) were the fragments of muscle tissue or feathers fixed in 96% ethanol and were provided by the Zoological Museum of Moscow State University (MSU) and the Oka Biosphere Reserve from their own collection funds within the framework of scientific cooperation. For most of the samples under study, it was possible to establish the

Table 1

Subspecies of the common kingfisher, sizes

Region	Sex	Wing length			Beak length**		
		n	lim	\bar{X}	n	lim	\bar{X}
<i>A. a. ispida</i>							
Western Europe	♂	51	76–81	78,3	26	30–36	33,5
	♀	63	76–81	78,2	34	30–35	32,7
Estonia	♂	13	75–82	78,1	12	31–41	35,9
	♀	3	78–80	79,3	3	30–39	33,7
<i>A. a. atthis</i>							
Western Europe, Northwest Africa	♂	12	74–79	76,8	10	35–39	36,2
	♀	13	75–80	77,5	10	33–37	34,9
Ryazan region	♂	94	73–80	76,0	105	28,5–36,6	32,9
	♀	171	74–80	76,7	139	29,2–34,8	32,1
Kazakhstan	♂	20	70–76	–	–	–	–
	♀	19	71–78	–	11	30–40	–
Kyrgyzstan	♂♀	7	70–76	–	7	28–35	–
<i>A. a. bengalensis</i>							
China, Indonesia	♂	19	69–76	72,1	18	31–35	33,4
	♀	41	69–76	72,4	32	31–35	32,2
Sakhalin	♂♀	5	71–74,5	–	5	27,7–35	–

Note. * — the ranges of values are given according to the literature data; ** — the beak length from the anterior edge of the nostril; n — the studied sample volume, specimens; lim — value limits, mm; \bar{X} — the average value, mm

subspecies affiliation according to morphological criteria (Tabl. 2).

The comparative analysis also included 29 COI sequences of the kingfishers of different regions of the species area obtained from NCBI: the Netherlands — KF946582.1, KF946585.1, KF946583.1, KF946584.1 and KF946586.1; South Korea — EF515759.1; Cyprus — KT803622.1; Turkey (Iğdir-Tuzluca) — KX283101.1, KX283100.1 and KX283102.1; Sweden — GU571710.1 (OsterGotland), GU571709.1 (Halland); Norway (Telemark) — GU571232.1; Japan — AB842527.1, AB842533.1 (Kyushu-chiho), AB843345.1 (Honshu), AB843344.1 (Hokkaido-chiho), AB842534.1, AB842531.1 (Kanto-chiho), AB842529.1, AB842528.1 (Okinawa), AB842532.1 (Ibaraki) and AB842530.1 (Tohoku-chiho); Kazakhstan (Almaty Oblysy) — GQ481308.1; Mongolia (Dornod) — GQ481311.1; Philippines (Quezon) — JF957001.1; Russia — GQ481309.1 (Khabarovsk Krai), GQ481310.1 (Krasnodar

Krai) and GQ481312.1 (Primorsky Krai). For the Netherlands kingfisher sequences, their subspecies affiliation is indicated in NCBI — *A. a. ispida*. Thus, the total volume of the sample analyzed included 66 nucleotide sequences.

Total DNA was isolated using the Animal and Fungi DNA Preparation Kit (Jena Bioscience) according to the manufacturer's instructions. To analyze the genetic structure of kingfisher populations, we used a region of the first subunit of the cytochrome oxidase mitochondrial gene (*COI*) amplified by the nested PCR method with the primers proposed in the works of Hebert et al. [9], Kerr et al. [10]: external — CO1ExtF (5'-acgc ttaacactcagccatcttacc-3') and CO1ExtR (5'-aacca gcatatgagggttcgattcct-3'); internal — BirdF1 (5'-tt ctccaaccacaaagacattggcac-3') and BirdR1 (5'-acg tgggagataattccaaatcctg-3').

The amplification was carried out in 25 μ l of the reaction mixture containing 2.5 μ l of 10x buffer with $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 2.5 μ l of 10xdNTPs mix; 1.5 mM MgCl_2 ; 10 pmol of each primer; 0.02 units of Taq polymerase; and 2-3 μ l of DNA.

Table 2

Kingfisher biomaterial samples used in the study

No.	Sample code	Bird catching location	Coordinates	Collection date	Subspecies	Age, sex	Other information
<i>Biomaterial samples from the territory of Belarus (original collections of the authors)</i>							
1	AV6	Grodno Region, Grodno District, the village of Lukavitsa	53.865685 23.798932	20/06/2008		adult	YA0028
2	AV77	Mogilev Region, Cherikov District, the Sozh River, the village of Vėprin	53.547285 31.526141	09/07/2008	<i>ispida</i>	adult, female	YA0539
3	AV78	Mogilev Region, Cherikov District, the Sozh River, the village of Ustye	53.610615 31.539383	09/07/2008	<i>ispida</i>	adult, male	YA0538
4	AV80	Mogilev Region, Osipovich District, the Berezina River, the village of Chuchoye	53.358582 29.010562	12/06/2008	<i>ispida (a beak)/ atthis (a wing)</i>	adult, male	YA0535
5	AV81	Mogilev Region, Osipovich District, the Berezina River, the village of Krasnoye	53.326541 29.049908	13/06/2008	<i>ispida</i>	adult, male	YA0536
6	AV82	Minsk Region, Volozhin District, the Isloch River	54.014162 26.643196	28/06/2008	<i>ispida</i>	adult, female	YA0537
7	AV83	Grodno Region, Korelich District, the Neman River	53.498469 26.238029	23/07/2008	<i>ispida</i>	adult, male	YA0540
8	AV84	Grodno Region, Korelich District, the Neman River	53.498469 26.238029	23/07/2008		adult, male	YA0541
9	AV207	Gomel Region, Lelchitsy district, the Ubort River, the village of Borovoe	51.78149 28.128533	29/05/2006	<i>ispida</i>	adult, male	YA0530
10	AV208	Gomel region, Lelchitsy District, the Ubort River, the village of Borovoe	51.78149 28.128533	30/05/2006	<i>ispida</i>	adult, male	YA0531
11	AV209	Gomel Region, Lelchitsy District, the Ubort River, the village of Borovoe	51.78149 28.128533	31/05/2006	<i>ispida</i>	adult, male	YA0532
12	AV652	Belarus		02/2016			
13	AV1157	Brest Region, Kamenets District, the village of Kamenyuki	52.558354 23.79621	03/08/2012		juvenile, female	GVV149
14	AV3033	Brest Region, Brest District, the city of Brest, fortress	52.085603 23.655606	15/07/2016		female	GVV172
15	AV3746	Minsk Region, Cherven District, the village of Turets	53.663864 28.077750	02/08/2020		male	
16	AV4027	Brest Region, Kamenets District, the village of Zenki	52.349982 23.706838	08/2020			

End of the Table 2
Kingfisher biomaterial samples used in the study

No.	Sample code	Bird catching location	Coordinates	Collection date	Subspecies	Age, sex	Other information
<i>Biomaterial samples from the territory of Russia (from the collections of the Oka Reserve and the Zoological Museum of Moscow State University)</i>							
17	AV462	Ryazan Region, Oksky Nature Reserve	54.75449 40.750141			juvenile	
18	AV463	Ryazan Region, Oksky Nature Reserve	54.75449 40.750141			juvenile	
19	AV464	Ryazan Region, Oksky Nature Reserve	54.75449 40.750141			juvenile	
20	AV465	Ryazan Region, Oksky Nature Reserve	54.75449 40.750141			juvenile	
21	AV466	Ryazan Region, Oksky Nature Reserve	54.75449 40.750141			juvenile	
22	AV467	Ryazan Region, Oksky Nature Reserve	54.75449 40.750141			juvenile	
23	AV2116	Ryazan Region, Oksky Nature Reserve	50.150926 142.750797	03/05/2002		male	RYA 652
24	AV2117	Sakhalin Island	50.150926 142.750797	21/05/2004		female	CBH 465
25	AV2118	Sakhalin Island	50.150926 142.750797	06/05/2004		male	CBH 358
26	AV2119	Sakhalin Island	50.150926 142.750797	12/05/2004		male	CBH 372
27	AV2122	Sakhalin Island	46.368636 96.257546	04/06/2011		male	1310
28	77A	Altai Republic	54.893871 20.280016	2006	<i>ispida</i>	adult, male	AV02120*
29	CBH2196	Kaliningrad Region, Zelenogradsky District, Romanovo village outskirts	48.570504 142.750815	14/05/2008		adult, male	AV02110
30	CBH2680	Sakhalin Island, Makarovsky District, Porechye village outskirts	47.494011 142.661675	14/05/2009		adult, male	AV02111
31	MIM164	Sakhalin Island, Dolinsky District, Sovetskoye village outskirts, the Sinyaya River	50.991114 142.800671	16/06/2010		male	AV02113
32	RYA383	Sakhalin Island, Tymovsky District, the Slavka River	44.374964 133.098336	15/05/2002	<i>bengalensis</i>	male	AV02099
33	RYA437	Primorsky Krai, Anuchinsky District, Siny Ridge, Sinegorka Hill outskirts	44.374964 133.098336	18/05/2002	<i>bengalensis</i>	male	AV02100
34	RYA1084	Primorsky Krai, Anuchinsky District, Siny Ridge, Sinegorka Hill outskirts	46.368991 141.934821	27/06/2003	<i>japonica</i>	male	AV02106
35	RYA1155	Ryazan Region, Oksky Nature Reserve	46.368991 141.934821	02/07/2003	<i>japonica</i>	male	AV02107
36	RYA2325	Ryazan Region, Oksky Nature Reserve	45.128128 37.040854	24/09/2006	<i>atthis</i>	adult, female	AV02108
37	RYA2792	Ryazan Region, Oksky Nature Reserve	46.802877 142.735939	23/05/2009		adult, female	AV02109

Note. AV462–AV467 — biomaterial samples from the chicks of the same brood; * — the sample independently studied by other authors and deposited in the NCBI database during the preparation of this Article (=GQ481307.1)

The mixture was brought to the required volume with sterile deionized water. When working with difficult DNA samples, adding 1 µl of DMSO to the reaction mixture proved effective. The amplification program included 30 cycles in the mode of 95°C for 30 sec, 58°C for 30 sec, 72°C for 1.5 min with preliminary denaturation at 95°C for 1 minute and the extension of chains for 5 minutes at 72°C.

The amplification products were subjected to electrophoretic separation in 1.2% agarose gel containing ethidium bromide. The studied region of mitochondrial DNA is a fragment of the beginning of the first subunit of the cytochrome oxidase gene (*COI*) of 561 bp located from 145th to 705th site of the complete sequence (GenBank ID: NC_035868.1).

The DNA sequencing and subsequent analysis were carried out on the AppliedBiosystems 3130 sequencer at the Institute of Bioorganic Chemistry, NAS of Belarus (Minsk). Each DNA sample was sequenced in both directions to minimize possible misreading. The alignment and analysis of obtained sequences, the calculation of nucleotide (π) and haplotype (h) diversity indices and genetic differentiation indicators were performed using the MEGA ver. 11 [11], DnaSP v5 [12], Arlequin ver. 3.5.2.2 [13] software packages.

The genetic structure of the common kingfisher was reconstructed using the maximum likelihood (ML) method in MEGA ver. 11. The sequences of the shining-blue kingfisher *Alcedo quadibrachys* (JQ173940.1 and JQ173939.2) were used as an outgroup. Genetic distances were calculated based on the Hasegawa-Kishino-Yano (HKY) model selected using the ModelTest program. The phylogenetic tree was constructed using MrBayes v3.2.7 [14]. HKY was used as a nucleotide substitution model. The trees were searched using 4 Markov chains (3 hot and 1 cold) with 2 million generations and data collection every 1000 generations, as well as with the removal of 25% of the trees at the burn-in stage. The consensus tree visualization was performed using FigTree v1.4.41. The phylogeographic networks of haplotypes were constructed using PopART ver.1.7.

Results and Discussion

The obtained results on the catching and assessing of the morphometric parameters of

49 adult common kingfishers showed that 18 out of 20 of the examined birds (90%) in the northwest of Belarus relate to the subspecies *ispida* and only 2 (10%) to the subspecies *atthis*. In the southeast of the country, 15 out of 29 of the examined birds (52%) relate to *ispida* and 14 (48%) to *atthis*. Thus, it was established that the form morphologically defined as *A. a. ispida* is predominant (67.3%) and is distributed throughout Belarus; and the form *atthis* with an occurrence rate of 32.7% is found mainly in the southeast of the country (Fig. 2).

However, the analysis of differences between 66 studied nucleotide sequences of the conservative *COI* gene of mitochondrial DNA (Fig. 3) did not reveal any significant clustering in the kingfisher in the area and, in particular, in Belarus. The bootstrap indices (BI) in all branches, except one, are below 50%. Only two sequences are reliably clustered together (BI = 61%) — CBH2196 and KX283101.1 from Sakhalin and Turkey, respectively, differing from each other by one variable site. It shows that the division of the kingfisher population is not revealed on the basis of the genetic marker *COI* that has proved successful in distinguishing subspecies in some animal taxa. Overlapping of features is also observed in the morphological division of subspecies *ispida* and *atthis*.

Overall, out of 561 homologous positions in the *COI* sequences examined, 11 (1.96%) were variable and 5 (0.89%) were parsimoniously

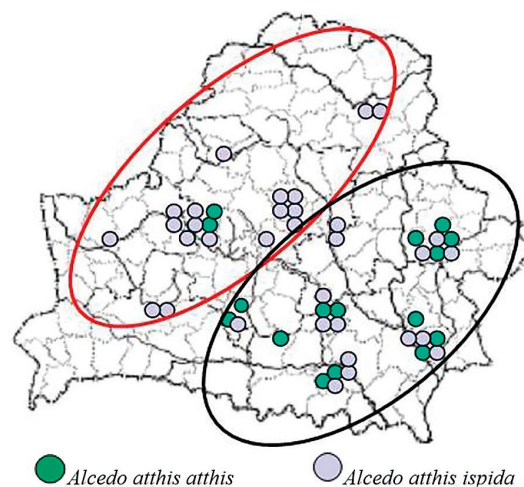


Fig. 2. Distribution of common kingfisher subspecies in Belarus determined on the basis of morphological characteristics

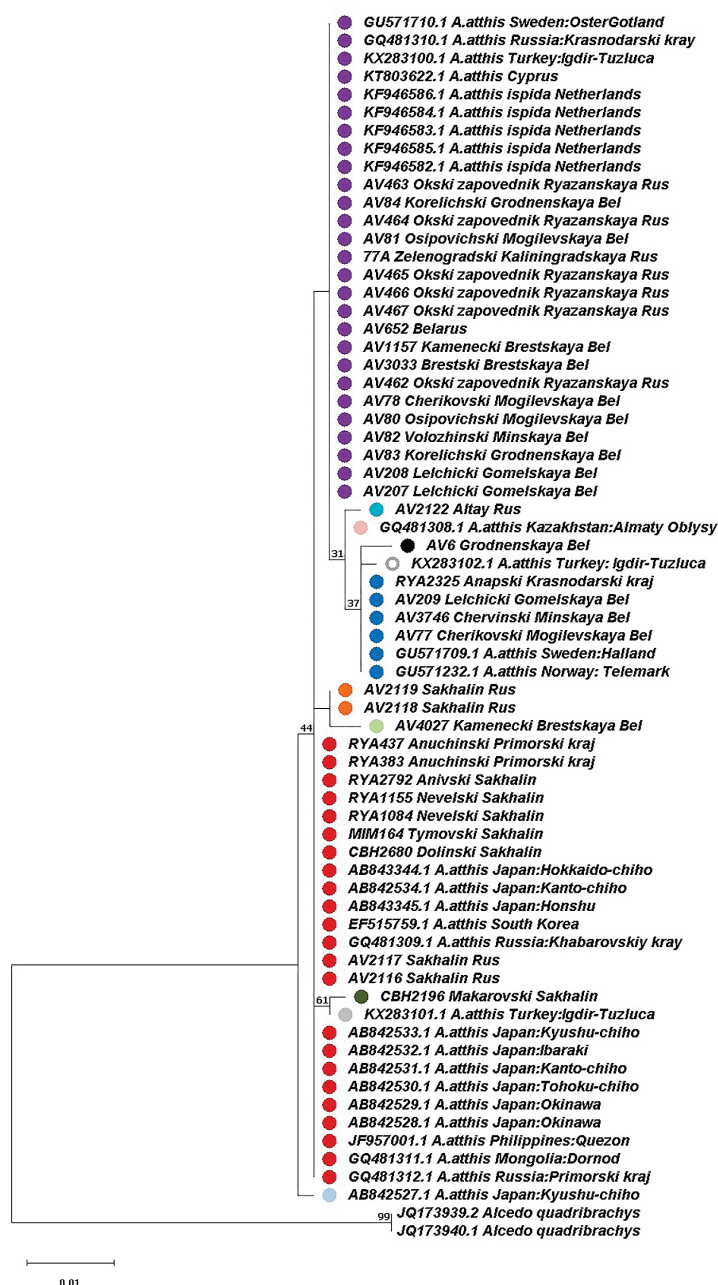


Fig. 3. The dendrogram of genetic differences between the nucleotide sequences of the mitochondrial *COI* gene in the common kingfisher in the area (ML method, HKY model, 500 replicas; IB > 30%). Markers of the same color indicate sequences belonging to the same haplotype

informative (Tabl. 3).

A total of 12 haplotypes were identified, and among them, Hap3 (27 samples, 40.91%), Hap1 (23 samples, 34.85%) and Hap5 (6 samples, 9.09%) were most common. Haplotype Hap10 combined two sequences (3.03%). The proportion of rare haplotypes (Hap2, Hap4, Hap6, Hap7, Hap8, Hap9, Hap11 and Hap12) represented by a single nucleotide sequence was 12.12% in total.

Probably, these haplotypes can be considered unique, although the relatively small volume of the studied sample should be taken into account. Haplotypes Hap1–Hap7 were previously described by other authors and were named in our work in accordance with the published materials of the international conference [15]. Our studies revealed five new rare haplotypes Hap8–Hap12. The kingfisher population in Belarus

Table 3

Haplotype diversity found in the common kingfisher across the species area

Haplotypes	Sites (from the beginning of the <i>COI</i> gene; GenBank ID: NC_035868.1)											Number and labeling of samples related to the haplotype
	225	231	234	255	277	396	420	504	615	657	695	
Hap1	A	C	A	C	A	A	T	T	T	T	A	23: RYA383, RYA437, RYA1084, RYA1155, RYA2792, MIM164, CBH2680, AV2116, AV2117, GQ481309.1, GQ481311.1, GQ481312.1, EF515759.1, JF957001.1, AB842528.1–AB842534.1, AB843344.1, AB843345.1
Hap2	A	T	A	C	A	A	T	T	C	T	A	1: AB842527.1
Hap3	A	C	G	C	A	A	T	T	T	T	A	27: AV78, AV80–AV84, 77A, AV207, AV208, AV652, AV462–AV467, AV1157, AV3033, KT803622.1, KF946582.1–KF946586.1, KX283100.1, GU571710.1, GQ481310.1
Hap4	A	C	G	C	A	C	T	T	T	T	A	1: GQ481308.1
Hap5	A	C	G	C	A	C	T	C	T	T	A	6: RYA2325, AV209, AV77, AV3746, GU571709.1, GU571232.1
Hap6	A	C	A	C	A	A	C	T	T	T	A	1: KX283101.1
Hap7	A	C	G	T	A	C	T	C	T	T	A	1: KX283102.1
Hap8	A	C	A	C	A	A	C	T	T	C	A	1: CBH2196
Hap9	G	C	G	C	G	C	T	C	T	T	A	1: AV6
Hap10	A	C	A	C	A	A	T	T	T	T	C	2: AV2118, AV2119
Hap11	A	C	G	C	A	C	T	T	T	T	C	1: AV2122
Hap12	A	G	G	C	A	A	T	T	T	T	C	1: AV4027

Note. The parsimoniously informative sites with nucleotide substitutions are marked in bold

is represented by the haplotypes Hap3 (11 out of 16 Belarusian sequences, 68.75%), Hap5 (3 sequences, 18.75%), Hap9 (1 sequence, 6.25%) and Hap12 (1 sequence, 6.25%).

The parsimonious network of kingfisher haplotypes (Fig. 4A) demonstrates a honeycomb phylogeny with the dominance of three main haplotypes — Hap1, Hap3 and Hap5, which can apparently be considered ancestral. Analysis of the geographic distribution of kingfisher haplotypes revealed a significant connection between the haplotype Hap1 and the *bengalensis* subspecies area. The haplotype was found only in the Far East and Japan, not in the European part of

Eurasia. Other well-represented haplotypes Hap3 and Hap5 were found only in the *ispida* and *atthis* subspecies areas (Fig. 4B).

It should be noted that the distribution of the haplotype Hap1 in the *bengalensis* subspecies area also correlates with the morphological information on the affiliation of the kingfishers represented by samples RYA383 and RYA437 to this subspecies. Kingfisher biomaterial samples RYA1084 and RYA1155, determined as affiliated to the subspecies *japonica*, are also attributed to the haplotype Hap1. Previously, various authors [16] identified the *japonica* form, inhabiting Sakhalin, Japan and Taiwan, as differing from

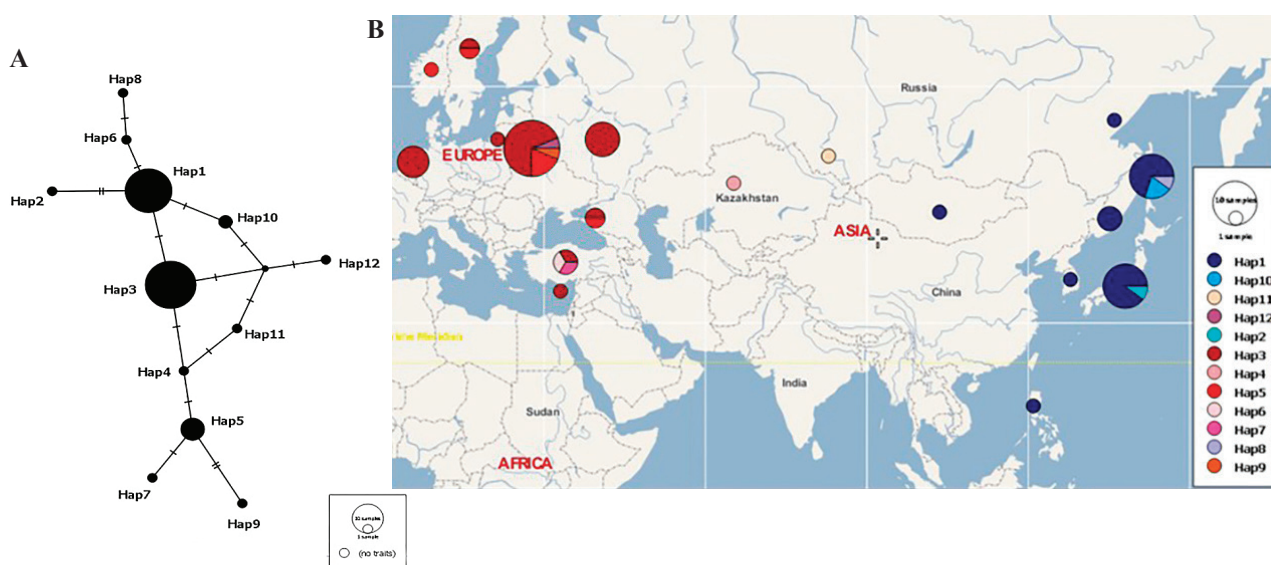


Fig. 4. The haplotype network (A) and phylogeography (B) of the common kingfisher by the mitochondrial gene *COI*. The size of the circles is proportional to the number of sequences representing each haplotype; the cross bars on the lines connecting the haplotypes indicate the number of nucleotide substitutions

bengalensis in its longer wing. However, O. Austin and N. Kuroda [17], having compared the sizes of 20 kingfishers, did not find significant differences between the island and continental populations.

Out of 14 kingfisher samples identified morphologically as the *ispida* form, 12 (AV78, AV81-AV83, 77A and KF946582-KF946586) related to the haplotype Hap3, which is 85.7%, and only 2 (AV77, AV209) related to the haplotype Hap5 (14.3%). Sample AV80 of the kingfisher, possessing both *ispida* (in the length of the beak) and *atthis* (in the length of the wing) features, also related to the haplotype Hap3. It should be noted that samples AV77 and AV209, although classified as *ispida* based on morphological features, were taken from birds in Mogilev and Gomel regions, respectively, i.e. in the southeastern part of Belarus — the distribution zone of the form *atthis*. If we consider the fact that the only sample of the morphologically verified *atthis* form RYA2325 represented haplotype Hap5, it can be assumed that a certain pattern can be traced in the predominant distribution of haplotype Hap3 among the *ispida* forms and Hap5 among the *atthis* forms. At the same time, both haplotypes have apparent Western Palearctic confinement.

When comparing the representation of kingfisher haplotypes in the Far Eastern and Western Palearctic parts of the species area separately (Fig. 5), the given populations were established

to differ in their haplotype composition and the topology of parsimonious networks formed by the proportion of haplotypes and nucleotide differences between them.

In the kingfisher population from the Far East region, 4 haplotypes were identified that form a “star-shaped” radiation pattern with the dominance of the ancestral haplotype (Hap1) and derivative haplotypes (Hap10, Hap8 and Hap2) spaced one or two substitutions apart from it, which clearly demonstrates the founder effect during the dispersal of early ancestral forms and indicates a recent origin of the population in the studied part of the area [18, 19]. At the same time, the topology of the haplotype network of the kingfisher from the Western Palearctic, demonstrating the presence of two ancestral haplotypes Hap3 and Hap5, which gave rise to 6 rare haplotypes, indicates a longer and more complex evolutionary history of its formation from a larger number of individuals, suggesting at least a two-fold expansion of the species in the territory under consideration. Previously [20], based on the analysis of the subspecies areas and the localization of fossil remains, it was suggested that the *atthis* and *ispida* forms of the kingfisher could be formed as a result of different glacial cycles when a new settlement wave was bringing, during the next warming period, a parental form population from southwest Asia to

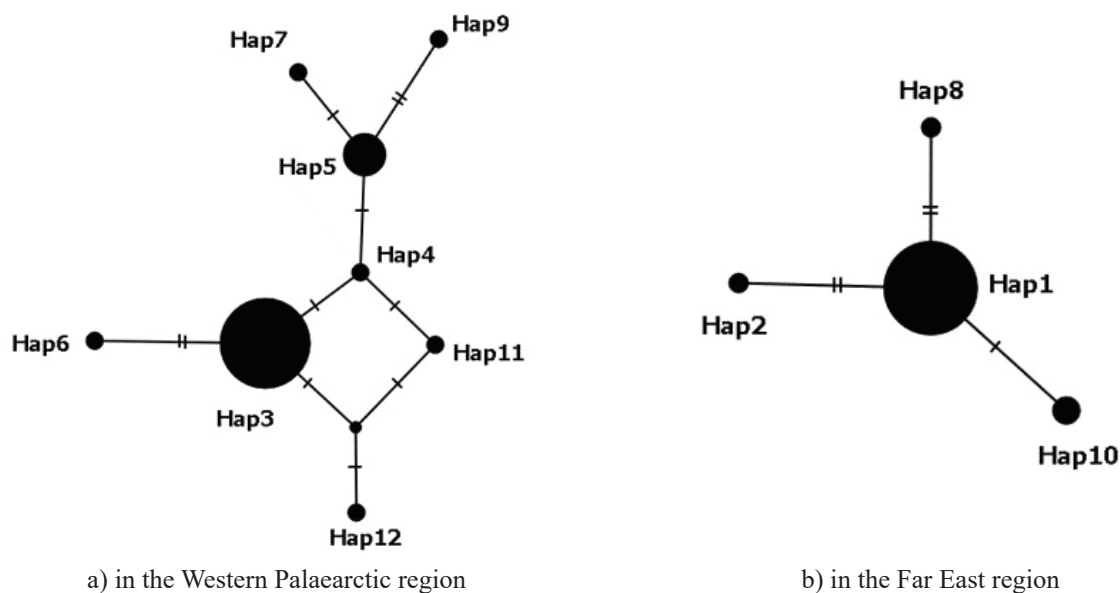


Fig. 5. Phylogenetic networks of kingfisher mtDNA haplotypes (by the *COI* gene) in different parts of the species area. The size of the circles is proportional to the number of sequences representing each haplotype; the cross bars on the lines connecting the haplotypes indicate the number of nucleotide substitutions

Europe. However, the population, settled earlier from the same center during the previous warming period, had already diverged morphologically by that time having found itself isolated in the Western European refugium during the period of maximum glaciation. As a result, two species populations successively settled from one center turn out to be taxonomically different at the subspecies level. Also, studying the modern area of the common kingfisher, it can be assumed that isolation mechanisms are present, causing further separation of Far East and Western Palaearctic groups due to the use of different places for nesting and wintering, despite originating from the single settlement center.

In support of the assumptions above, the Bayesian haplotype tree (Fig. 6) suggests the presence of at least two haplotype lines in the branched internal structure of the common kingfisher population. All haplotypes are separated from the outgroup (*Alcedo quadibrachys* Bonaparte, 1850) with high support (100%), indicating the genetic unity of different forms of *Alcedo atthis*. Haplotype Hap2 is closest to the outgroup, and the overall tree topology demonstrates the origin of Hap1, Hap3, Hap10 and Hap12 haplotypes from a common ancestral pool. Apparently, the given haplotypes characterized the population of the parental form of the kingfisher in the

refugium of Southwest Asia. Cluster 1, formed by haplotypes Hap4, Hap5, Hap7, Hap9, and Hap11 and represented mostly in the *atthis* form area (including the samples with morphologically established subspecies affiliation), is associated with a common ancestral pool, which may serve as confirmation of the formation of a new young form in subsequent settlement waves. Cluster 2, combining the haplotypes from Turkey (Hap6) and Sakhalin (Hap8), also confirms the common origin of the population from a single center.

Analysis of genetic diversity indices for the mitochondrial *COI* gene in the common kingfisher in the area (Tabl. 4) demonstrated relatively low values of nucleotide (0.00078) and haplotype (0.276 ± 0.01196) diversity with a small spread of values (SD HD = 0.109) in the Far Eastern population compared to the samples from the European areas of *ispida* and *atthis* subspecies (Pi — from 0.00139 to 0.00232; and Hd — from 0.389 ± 0.02703 to 0.604 ± 0.02248). The genetic diversity indices of the Belarusian kingfisher population (Hd = 0.517 ± 0.01752 ; Pi = 0.00232; K = 1.300), taken separately, are consistent with similar indices for *atthis* and *ispida* subspecies and are almost twice as high as the values established for the *bengalensis* subspecies.

Thus, the low values of kingfisher genetic diversity in the Far East region are not typical for

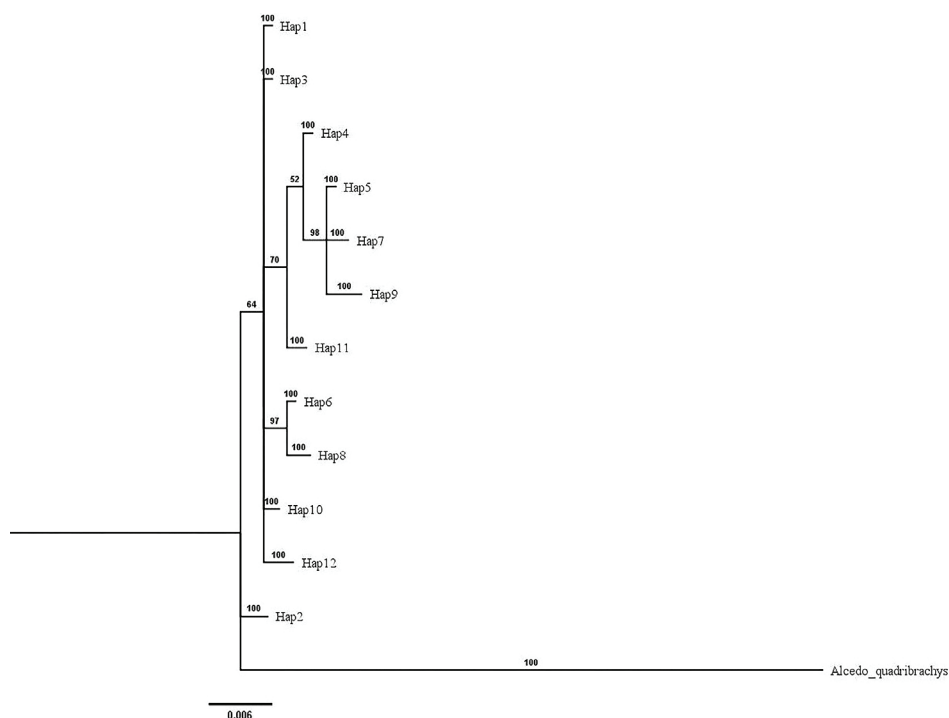


Fig. 6. The Bayesian phylogenetic tree of *Alcedo atthis* based on the mtDNA COI polymorphism.

A. quadribrachys sequences are taken from NCBI as an outgroup; posterior probabilities (%) are given above the lines

the species as a whole, but are explained by the presence of a pronounced founder effect (Tajima's $D = -1.96530$; Fu's $F_s = -2.546$; $P < 0,05$). In turn, relatively high levels of nucleotide and haplotype diversity of the kingfisher in the Western Palaearctic part of the area suggest a large effective population size.

The presence of genetic differentiation in the kingfisher within the area is also evidenced by the data of a comparative analysis of the average pairwise distances between the *COI* gene sequences, which are 0.002 in the Belarusian population and outside the country within the *atthis* subspecies area — 0.002; the *bengalensis*

Table 4

Genetic diversity indices of the common kingfisher by the mt gene *COI* in species area

Population	Ns	Nvs	Nh	Hd	SD HD	Pi	K	Tajima's D	Fu's Fs	P
<i>Belarus</i>	16	6	4	0.517 ± 0.01752	0.132	0.00232	1.300	-0.96202	0.337	>0.10
<i>atthis</i>	14	6	6	0.604 ± 0.02248	0.150	0.00227	1.275	-1.16440	-2.223	>0.10
<i>ispida</i>	9	2	2	0.389 ± 0.02703	0.164	0.00139	0.778	0.68731	1.702	>0.10
<i>bengalensis</i>	27	5	4	0.276 ± 0.01196	0.109	0.00078	0.439	-1.96530	-2.546	<0.05
<i>total</i>	66	11	12	0.711 ± 0.00139	0.037	0.00242	1.360	-1.28180	-5.238	>0.10

Note. Ns — the number of sequences; Nvs — the number of variable sites; Nh — the number of haplotypes; Hd — haplotypic diversity; SD HD — standard deviation of haplotypic diversity; Pi — nucleotide diversity; K — the average number of nucleotide differences; Tajama's D — the value of the Tajama's neutrality criterion (=0 for selectively neutral evolution; >0 for balancing selection and a sudden population decline, no rare alleles; <0 for the population increase after the bottleneck, rare alleles are missing; Fu's F_s — Fu's test for the selective neutrality of nucleotide substitutions (<0 population growth in the past / directional selection); P — the level of statistical significance

and *ispida* subspecies — 0.001, respectively. At the same time, the average level of pairwise genetic differences in the general Palearctic sample of the species is higher and amounts to 0.002 (0.00326 — when calculated in the DnaSP v5 program), which is generally consistent with the distance between the most common haplotypes Hap1 and Hap2 (0.00178). The interspecies difference between the studied DNA samples of the common kingfisher and the closely related shining-blue kingfisher *A. quadibrachys* selected as an outgroup is 2.5 times higher and amounts to 0.005.

Parameter calculation results of the genetic subdivision F_{st} , produced on the basis of both haplotype frequencies and pairwise differences (Tabl. 5), confirm the presence of statistically

significant ($P \leq 0,01$) strong genetic differentiation only between the populations of the Far East (the area of *bengalensis*) and the Western Palearctic (the areas of *ispida* and *atthis*, together and separately, including Belarus). Therefore, the populations of the kingfisher in the *atthis* and *ispida* subspecies areas may be considered as the genetically uniform population of the species formed from a larger number of ancestors during several settlement waves with an emerging tendency to form a separate haplotype line in the area of the taxonomic form *atthis*.

The examples of similar east-west genetic patterns in the Palearctic have been found in other birds, such as *Dendrocopos major* [21] and *Parus montanus* [22]. West and East European specific mtDNA haploclades are demonstrated by

Table 5

Parameters of the genetic subdivision (F_{st}) of subspecies and geographic populations of the kingfisher in the area

Subspecies	<i>bengalensis</i>	<i>ispida</i>	<i>Belarus</i>	<i>atthis</i>	<i>ispida-atthis</i>
<i>bengalensis</i>	–	0.68924	0.62481	0.59447	0.59543
<i>ispida</i>	0.67386	–	–0.07368	–0.03363	–0.05483
<i>Belarus</i>	0.59391	–0.07695	–	–0.02857	–0.03916
<i>atthis</i>	0.56605	–0.06718	–0.03737	–	–0.03168
<i>ispida-atthis</i>	0.54916	–0.06482	–0.03853	–0.03850	–

Note. The F_{st} values calculated based on haplotype frequencies are shown above the diagonal, while those calculated based on the pairwise differences are shown below

the little owl [23] and the great reed warbler [24]. Two divergent clades, the Western Palearctic and East Asian, have been established for pan-Palearctic bird species, such as the skylark [25] and the great grey shrike [26]. Studies on the North American continent have found a similar situation for the snow goose [27] and the raven [28] that exhibit two haploclades with a relatively clear geographical structure. The most plausible explanation for the emergence of two or more haploclades is glacial refugia [29, 30].

Conclusion

Thus, the taxonomic differentiation of the Far East population, defined as the subspecies *Alcedo atthis bengalensis*, coincides with its haplotype difference from the Western Palearctic

population, including *atthis* and *ispida* forms. Taken together, the analysis results above suggest that these two groups were formed as a result of two independent and oppositely directed settlement waves from the common South Asian center, with the kingfisher's population of the Far East clearly demonstrating the founder effect in the dispersal of early ancestral forms, and the kingfisher's populations in the Western Palearctic originated from a larger number of ancestors and were apparently formed due to a two-fold successive expansion of the species in the territory under consideration. This settlement pattern is supported by the topology of the phylogenetic tree and parsimonious networks, as well as by the disunity of the haplotype composition and the indices of genetic diversity characterizing the

groups “*bengalensis*” and “*atthis-ispida*”. Such a nature of nucleotide polymorphism indicates the evolution of sequences originating from one center, but proceeding in different directions primarily due to “settlement waves.” At the same time, such obvious genetic differences are not observed between the populations of the distinguished subspecies *atthis* and *ispida*. It may be due to the less obvious and prolonged isolation of the populations of these two forms during and after the end of the last anthropogenic glaciation.

In terms of haplotype composition and the level of genetic diversity, the Belarusian population of the kingfisher is part of the single Western Palaearctic population, despite the prevalence of *ispida* morphological forms in Belarus (67.3%) and the presence of the previously described integration zone of two European subspecies areas.

Since the conducted analysis had some methodological limitations due to focusing only on one mitochondrial marker, without taking into account the polymorphism of nuclear DNA, as well as due to a small sample size associated with the conservation status of the species, in the future, it is advisable to continue the study using a larger volume of material and other types of DNA markers.

The authors express their gratitude to the Zoological Museum of Moscow State University and the Oka State Natural Biosphere Reserve for the biomaterial samples provided and personally to A. V. Borisenko, A. A. Masalov, A. Ya. Redkin, A. V. Tsvetkov, I. V. Ganitsky, I. V. Donchenko, V. N. Sotnikov, A. A. Panyutina, E. L. Yakhontov, G. K. Puzankevich, M. G. Dmitrenok, V. V. Demyanchik, A. N. Kuzmitsky, A. E. Vinchevsky, and D. V. Zhuravlev. The authors also thank the anonymous reviewer for valuable comments that improved the quality of the manuscript. The study was carried out with the financial support of BRF-FR B21ARM-017.

References

1. Birds of Russia and Adjacent Territories. A New Fundamental Guide to the Birds of Russia, 2011–2024. – URL: <https://www.egir.ru/> (date of access: 05.02.2026).
2. Stepanyan, L. S. Outline of the ornithofauna of the USSR / L. S. Stepanyan. – M.: «Nauka», 1990. – 726 p.
3. Tugarinov, A. Ya. Wintering of birds in Talish / A. Ya. Tugarinov, E. V. Kozlova-Pushkareva // Azerbaijan branch of the USSR Academy of Sciences. Zoological series. – Baku, 1935. – Iss. 23. – 124 p.
4. Zedlitz, O. Liste der im Gebiete der Schara beobachteten Vogel / O. Zedlitz // Journ. Ornithol. – Jg 65, Bd.II. – 1917. – P. 278–308.
5. Fedyushin, A. V. Materials for the study of birds of eastern Belarus / A. V. Fedyushin. – Minsk, 1928. – 59 p.
6. Stanchinskiy, V. V. Towards the knowledge of the ornithofauna of Gomel and Rechitsa Polesie / V. V. Stanchinskiy // Scientific News of Smolensk State University. – Vol. 5, Iss. 1. – 1929. – P. 77–155.
7. Grichik, V. V. On the subspecies affiliation of some bird species in Belarus / V. V. Grichik // Problems of studying, preserving and using biological diversity of the animal kingdom: Abstracts of the Seventh Zoological Conference. – Minsk, 1994. – P. 284–286.
8. Grichik, V. V. Geographic variability of the birds of Belarus / V. V. Grichik. – Minsk: BSU, 2005. – 169 p.
9. Hebert, P. D. N. DNA barcodes for 1/1000 of the animal kingdom / P. D. N. Hebert, J. R. de Waard, J. F. Landry // Biology Letters 6. – 2010. – P. 359–362.
10. Comprehensive DNA barcode coverage of North American birds / K. C. R. Kerr, M. Y. Stoeckle, C. J. Dove [et al.] // Mol Ecol Notes. – 2007. – Vol. 7. – P. 535–543.
11. Tamura, K. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11 / K. Tamura, G. Stecher, S. Kumar // Molecular Biology and Evolution. – 2021. – Vol. 38, Iss. 7. – P. 3022–3027.
12. Librado DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data / Librado, J. Rozas // Bioinformatics. – 2009. – Vol. 25, Iss. 11. – P. 1451–1452.
13. Excoffier, L. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows / L. Excoffier, H. E. Lischer // Mol Ecol Resour. – 2010. – Vol. 10, Iss. 3. – P. 64–67.
14. Huelsenbeck, J. P. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees / J. P. Huelsenbeck, F. Ronquist // Bioinformatics. – 2001. – Vol. 17.

– P. 754–755.

15. Margawati, E. T. Genetic diversity in the partial cytochrome oxidase subunit I (*COI*) gene of common Kingfisher (*Alcedo atthis*) / E. T. Margawati, W. P. B. Putra // AIP Conf. Proc. – 2023. – Vol. 2972, Iss. 1. – P. 030004.

16. Howard, R. A complete check-list of the birds of the World / R. Howard, A. Moore. – London: Oxford Univ. Press, 1980. – 731 p.

17. Austin, O. L. The birds of Japan, their status and distribution / O. L. Austin, N. Kuroda // Bull. Mus. Compar. Zool. – 1953. – Vol. 109, № 4. – P. 248–637.

18. Rogers, A. R. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences / A. R. Rogers, H. C. Harpending // Molecular biology and evolution. – 1992. – Vol. 9, Iss. 3. – P. 552–569.

19. Rogers, A. R. Genetic evidence for a Pleistocene population expansion / A. R. Rogers // Evolution. – 1995. – Vol. 49. – P. 608–615.

20. Nikiforov, M. E. Formation and structure of the ornithofauna of Belarus / M. E. Nikiforov. – Minsk: Belorusskaya nauka, 2008. – 298 p.

21. Zink, R. M. Phylogeographic patterns in the great spotted woodpecker *Dendrocopos major* across Eurasia / R. M. Zink, S. V. Drovetski, S. Rohwer // J. Avian Biol. – 2002. – Vol. 33. – P. 175–178.

22. Phylogeography of the Eurasian Willow Tit (*Parus montanus*) based on DNA sequences of the mitochondrial cytochrome b gene / W. Salzburger, J. Martens, A. A. Nazarenko [et al.] // Mol. Phylogenet. Evol. – 2002. – Vol. 24. – P. 26–34.

23. Phylogeography and Pleistocene refugia

of the Little Owl *Athene noctua* inferred from mtDNA sequence data / P. Pellegrino I, A. Negri, M. Cucco [et al.] // Ibis. – 2014. – Vol. 156. – P. 639–657.

24. Postglacial colonisation patterns and the role of isolation and expansion in driving diversification in a passerine bird / B. Hansson, D. Hasselquist, M. Tarka [et al.] // PLoS ONE. – 2008. – Vol. 3. – P. 1–8.

25. Mitochondrial phylogeographies of five widespread Eurasian bird species / R. M. Zink, A. Pavlova, S. Drovetski, S. Rohwer // J Ornithol. – 2008. – Vol. 149. – P. 399–413.

26. The *Lanius excubitor* (Aves, Passeriformes) conundrum-Taxonomic dilemma when molecular and non-molecular data tell different stories / U. Olsson, P. Alström, L. Svensson [et al.] // Mol. Phylogenet Evol. – 2010. – Vol. 55. – P. 347–357.

27. Quinn, T. W. The genetic legacy of Mother Goose — phylogeographic patterns of lesser snow goose *Chen caerulescens caerulescens* maternal lineages / T. W. Quinn // Mol. Ecol. – 1992. – Vol. 1. – P. 105–117.

28. Webb, W. C. Random interbreeding between cryptic lineages of the Common Raven: evidence for speciation in reverse / W. C. Webb, J. M. Marzluf, K. E. Omland // Mol. Ecol. – 2011. – Vol. 20. – P. 2390–2402.

29. Avise, J. C. Phylogeography: the history and formation of species / J. C. Avise. Cambridge: Harvard University Press, 2000. – 447 p.

30. Weiss, S. Phylogeography of Southern European Refugia / S. Weiss, N. Ferrand. – Dordrecht: Springer, 2007. – 359 p.

М. Е. Никифоров¹, Е. Э. Хейдорова², М. В. Тарантович¹, К. В. Гомель¹

ТАКСОНОМИЧЕСКАЯ ПОДРАЗДЕЛЕННОСТЬ ОБЫКНОВЕННОГО ЗИМОРОДКА (*ALCEDO ATTHIS*) В БЕЛАРУСИ В СОПОСТАВЛЕНИИ С ГЕНЕТИЧЕСКОЙ СТРУКТУРОЙ ВИДА В ПАЛЕАРКТИЧЕСКОМ АРЕАЛЕ

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

²Учреждение образования
«Белорусский государственный медицинский университет»
Республика Беларусь, 220083, г. Минск, пр. Дзержинского, 83
e-mail: hejkatm@gmail.com

Нуклеотидные последовательности участка гена *COI* мтДНК использовались для оценки генетической структуры и филогеографии *Alcedo atthis* в палеарктическом ареале. Анализ географической приуроченности предковых гаплотипов зимородка показал значительную связь *Har1* с ареалом подвида *bengalensis* (Дальний Восток и Япония), а *Har3* и *Har5* — с распространением форм *ispida* и *atthis* (европейская часть Палеарктики), соответственно. Выявлена статистически значимая ($P \leq 0,01$) генетическая дифференциация только между популяциями зимородка в дальневосточной и западнопалеарктической частях ареала, в связи с чем популяции зимородка в ареалах подвидов *atthis* и *ispida* можно рассматривать как единую генетическую популяцию вида. Белорусская популяция зимородка является частью генетически единой западнопалеарктической популяции, несмотря на преобладание на территории Беларуси морфологических форм *ispida* (67,3%) и наличие здесь ранее описанной зоны интеграции ареалов двух европейских подвидов.

Keywords: зимородок, *Alcedo atthis*, *COI*, подвиды, географическая изменчивость, филогеография, таксономическая дифференциация.

Дата поступления в редакцию: 10 февраля 2026 г.

В. Н. Кипень

ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ ВИДОВ *BOS TAURUS* И *BISON BONASUS* ПО РЕЗУЛЬТАТАМ БИОИНФОРМАТИЧЕСКОГО АНАЛИЗА ГЕНОМОВ

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

По результатам биоинформатического анализа 2542 геномов европейского зубра (*Bison bonasus*) и домашнего быка (*Bos taurus*) выявлены однонуклеотидные полиморфные варианты (SNV, Single Nucleotide Variant) и их кластеры с высоким дискриминирующим потенциалом. На основании статистического анализа три SNV отобраны как наиболее информативные для дифференциации европейского зубра и КРС (*Bos taurus_UMD_3.1.1* (GCF_000003055.6)): rs41590141, rs110457178, rs41609042. Также предложена модель дифференциации двух биологических видов и обсуждены перспективы использования модели для определения гибридных особей.

Ключевые слова: европейский зубр, домашний бык (корова), крупный рогатый скот, полиморфный вариант, ДНК, генотипирование *in silico*, дифференциация.

Для цитирования: Кипень, В. Н. Дифференциация биологических видов *Bos taurus* и *Bison bonasus* по результатам биоинформатического анализа геномов / 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, 2026. – Т. 40. – С. 53–63.

Введение

По данным на конец 2025 г., в Беларуси насчитывалось более 2,9 тыс. особей зубров, что составляет 24% от мировой популяции. Крупнейшая популяция сосредоточена в Национальном парке «Беловежская пуца» (Брестская область) [1]. Популяции численностью более 100 особей зарегистрированы еще в шести местообитаниях, распределенных по областям страны: государственное опытное лесохозяйственное учреждение «Осиповичский опытный лесхоз», сельскохозяйственный производственный кооператив «Озёры Гродненского района», охотхозяйство «Красный Бор», Полесский государственный радиационно-экологический заповедник, республиканский ландшафтный заказник «Налибокский» и национальный парк «Припятский».

Зубр (*Bison bonasus*) включен в Красную книгу Республики Беларусь как вид, находящийся под угрозой исчезновения. В связи с этим охота на него строго регламентирована

действующим законодательством и допускается лишь в исключительных случаях на основании специальных разрешений [2].

Исследование биологических образцов зубра в экспертной криминалистической практике сопряжено со значительными методологическими сложностями, обусловленными выраженным дефицитом внутривидового полиморфизма. Реконструкция популяции вида, осуществленная на основе ограниченного числа особей, репатриированных из зоологических парков, привела к формированию генетически гомогенной группы, все представители которой находятся в тесном филогенетическом родстве. Анализ структурной организации D-петли митохондриальной ДНК (мтДНК), проведенный на репрезентативной выборке с использованием данных международной базы GenBank, выявил идентичность гаплотипов у исследованных образцов [3, 4].

Также в рамках изучения генетического разнообразия вида *Bison bonasus* проведены полногеномные исследования с применени-

ем ДНК-чипов, изначально разработанных для анализа генома крупного рогатого скота (КРС), в частности платформы BovineSNV50 Genotyping BeadChip и BovineHD Genotyping BeadChip (Illumina Inc., США). Применение ДНК-чипов позволило одновременно анализировать тысячи SNV (Single Nucleotide Variant), что существенно повысило эффективность генетических исследований. Значимым этапом в изучении генетики зубра стало исследование К. Oleński с соавторами, в рамках которого было проведено полногеномное исследование 163 особей *Bison bonasus* с использованием BovineHD (Illumina Inc., США) [5]. В результате проведенных исследований сформирована панель, включающая 100 SNV для идентификации особей зубра. В исследовании М. Wojciechowska с соавторами также разработаны различные функциональные панели SNV: для идентификации особей зубра (50 SNV), для выявления гибридизации с *Bos taurus* и *Bison bison* (20 SNV), а также панель для оценки принадлежности *Bison bonasus* к генетической линии (30 SNV) [6].

Значительно больше исследований геномов *Bison bonasus* проведено с использованием микросателлитных локусов (STR, Short Tandem Repeats): О. Kostyunina и др. [4]; В. Gralak и др. [7]; К. Homel и др. [8]; R. Lapickis и др. [9]; К. Luenser и др. [10]; W. Olech и др. [11]; Т. Roth и др. [12]; М. Tokarska и др. [13]; А. Доцев и др. [14]; М. Михайлова и др. [15]. Сравнение генетического разнообразия зубра и КРС проведено в работах М. Михайловой и др. [15], О. Kostyunina и др. [4] и М. Tokarska и др. [13]. По данным аналитического обзора Н. А. Чурбаковой и др., только 46% из 48 STR-локусов КРС, апробированных на геноме *Bison bonasus*, характеризуются относительно высоким полиморфизмом, а именно имеют не менее четырех аллелей на локус [16]. Относительно SNV, по данным М. Tokarska и др., лишь около 2% из более чем 50 тыс. из BovineSNV50 BeadChip оказались полиморфными [13].

В Республике Беларусь при видовой идентификации биоматериала зубра применяется мтДНК, анализ которой был успешно апробирован и используется в Государственном комитете судебных экспертиз Республики Беларусь [17]. Предложенный подход позво-

ляет дифференцировать образцы, принадлежащие зубру (*Bison bonasus*), от биологического материала домашнего быка (*Bos taurus*).

Однако данная методика имеет ограничение в использовании. Известно, что мтДНК — наследственный материал, который содержится в митохондриях клеток и наследуется по материнской линии без рекомбинаций. У чистокровного зубра мтДНК будет соответствовать референсным последовательностям вида *Bison bonasus*. У зубробизона последовательность мтДНК будет соответствовать биологическому виду матери: если мать — зубр, то мтДНК будет идентична референсным последовательностям вида *Bison bonasus*; если мать — корова, то мтДНК будет соответствовать референсным последовательностям вида *Bos taurus*. Таким образом, анализ мтДНК выявляет материнскую линию, но не дает прямой информации об отцовстве. В этом случае для принятия обоснованного решения при проведении судебной биологической (генетической) экспертизы в криминалистике необходимо дополнять анализ ядерными маркерами (STR, SNV), которые отражают вклад обоих родителей. Следовательно, для полной верификации — комплексной генетической оценки гибридности — необходимо использовать комбинацию генетических маркеров: мтДНК (материнская линия), микросателлиты или SNV ядерной ДНК (оба родителя).

Ранее проведенные нами исследования демонстрируют, что данные, полученные в ходе проектов по высокопроизводительному секвенированию геномов животных (NGS, Next-Generation Sequencing), обладают значительным потенциалом в выявлении генетических маркеров, способствующих таксономической идентификации как отдельных видов, так и их межвидовых гибридных форм [18–20].

Таким образом, цель данного исследования — выявление SNV с высоким дифференцирующим потенциалом для определения принадлежности образцов к видам *Bos taurus* или *Bison bonasus* на основании биоинформатического анализа геномов.

Материалы и методы

Определение генома *in silico*

В рамках проведения виртуального генотипирования (*in silico*) были задействованы

геномные последовательности животных, депонированные в репозитории Sequence Read Archive (SRA, NCBI). Процесс обработки данных включал этап скачивания, извлечения и конвертации геномной информации в формат fasta посредством программного обеспечения SRA-Toolkit v.2.11. Последующий анализ генотипических характеристик осуществляли с применением специализированного программного обеспечения GENIS, обеспечивающего комплексную обработку данных NGS [21].

Был осуществлен анализ 2514 геномов *Bos taurus* (выборка «КРС»), а также всех геномов *Bison bonasus* (28 образцов), представленных в SRA-NCBI на момент проведения биоинформатического исследования. Соответственно, суммарно в биоинформатическом анализе использовали 2542 генома. Файлы с геномными данными получены в рамках 101 проекта по секвенированию геномов *Bos taurus*, а также в рамках 7 проектов по секвенированию

геномов *Bos taurus* (табл. 1).

Генотипирование *in silico* проведено для 5069 SNV из BovineSNV50 v3.0, что составляет 9,8% от всех SNV (A/C, A/G, A/T, C/G), представленных в чипе [22]. SNV были отобраны случайно с использованием функции случайных чисел «RV.Bernoulli», реализованной в SPSS v.20.0. SNV распределены по хромосомам 1–29 пропорционально их представленности в чипе BovineSNV50 v3.0. Было выдвинуто предположение, что данного объема экспериментальной биоинформатической части (10% от всей емкости чипа BovineSNV50 v3.0) должно быть достаточно для решения поставленной задачи, т. к., согласно результатам М. Tokarska и др., при анализе генома *Bison bonasus* с использованием BovineSNP50 на один полиморфный вариант приходится около 50 мономорфных [13]. Таким образом, при анализе 1/10 части SNV из BovineSNV50 нами может быть выявлено, предположительно, около 100 полиморфных

Таблица 1

Перечень проектов по секвенированию геномов *Bos taurus* и *Bison bonasus*, задействованных в биоинформатическом анализе

PRJDB14144	PRJEB28191	PRJEB29487	PRJEB31621	PRJEB35127	PRJEB35299
PRJEB36894	PRJEB38123	PRJEB38981	PRJEB42465	PRJEB42790	PRJEB44441
PRJEB45822	PRJEB46995	PRJEB47654	PRJEB51730	PRJEB52545	PRJEB53518
PRJEB55064	PRJEB5622	PRJEB56301	PRJEB58555	PRJEB59364	PRJEB59761
PRJEB60345	PRJEB60952	PRJEB64022	PRJEB64023	PRJEB64406	PRJEB65887
PRJEB68296	PRJEB76602	PRJNA1010533	PRJNA1013498	PRJNA1042650	PRJNA1042814
PRJNA1058368	PRJNA1067440	PRJNA1101073	PRJNA1105472	PRJNA1140538	PRJNA1141206
PRJNA176557	PRJNA238491	PRJNA312138	PRJNA325058	PRJNA343262	PRJNA350384
PRJNA350593	PRJNA350739	PRJNA357880	PRJNA379859	PRJNA386202	PRJNA391427
PRJNA396672	PRJNA411962	PRJNA422135	PRJNA422979	PRJNA431934	PRJNA432857
PRJNA474946	PRJNA492844	PRJNA494431	PRJNA513064	PRJNA514237	PRJNA526664
PRJNA534204	PRJNA544605	PRJNA574857	PRJNA575275	PRJNA598339	PRJNA604048
PRJNA612712	PRJNA634989	PRJNA658727	PRJNA663547	PRJNA691741	PRJNA698276
PRJNA752483	PRJNA761701	PRJNA762180	PRJNA762638	PRJNA780021	PRJNA781776
PRJNA783321	PRJNA814817	PRJNA823479	PRJNA853448	PRJNA855305	PRJNA887820
PRJNA889458	PRJNA896136	PRJNA898088	PRJNA905718	PRJNA927262	PRJNA932924
PRJNA936134	PRJNA950586	PRJNA970093	PRJNA978937	PRJNA994471	PRJEB29059*
PRJEB71066*	PRJEB75205*	PRJNA321590*	PRJNA321599*	PRJNA352108*	PRJNA427536*

Примечание. * — проекты по секвенированию геномов *Bison bonasus*

вариантов, среди которых и будут отобраны наиболее информативные для дифференциации европейского зубра и КРС.

Статистический анализ данных

Для оценки потенциала SNV в качестве дифференцирующих маркеров использовали многоклассовый ROC-анализ (Receiver Operating Characteristic analysis) из библиотеки `sklearn.metrics` в Python. SNV считали высокоэффективным маркером в том случае, если нижняя граница 95%-го доверительного интервала (ДИ) для площади под ROC-кривой (AUC, Area Under the Curve) превышала значение 0,9. Для расчета AUC использовали метод трапеций, реализованный в функции `auc()` из библиотеки `sklearn.metrics`. При расчете ДИ для AUC использовали бутстреп-метод (число итераций — 2000), расчеты проводили в среде разработки Jupyter Notebook.

Комплексную оценку дифференцирующего потенциала для совокупности SNV проводили с использованием программы MDR v.3.0.2 [23]. Вклад конкретного генотипа определяли посредством энтропии H (выраженной в %). При $H = 100\%$ генотип способен однозначно дифференцировать, к какой группе относится образец. В программе MDR для определения оптимальной модели дифференциации использовали следующие высококонсервативные настройки: диапазон количества атрибутов — от 1 до n (где n — количество переменных в модели); количество перекрестных проверок — 100; анализ топ-моделей — 1000; поиск конфигурации модели — исчерпывающий; метод сравнения — точный тест Фишера; классификация ячеек — неоднозначное назначение. Корректность модели оценивали по значению сбалансированной точности (`adj. Balanced Accuracy`) и коэффициенту Каппа (`Cohen's Kappa`). `Cohen's Kappa` (каппа Коэна) — статистический показатель, который измеряет согласованность оценок двух экспертов при категориальной разметке данных. В отличие от простой процентной доли совпадений, `Cohen's Kappa` показывает, насколько согласие превышает уровень, ожидаемый чисто случайно. Значения `Cohen's Kappa` $> 0,81$ принято интерпретировать как почти идеальное согласие.

Для вычисления точных 95%-ых ДИ для долей (частот) использовали метод Мон-

те-Карло (число итераций — 10 000) в среде разработки Jupyter Notebook.

Результаты и их обсуждение

Отбор наиболее информативных SNV состоял из двух этапов. На первом этапе были сформированы две тестовые выборки:

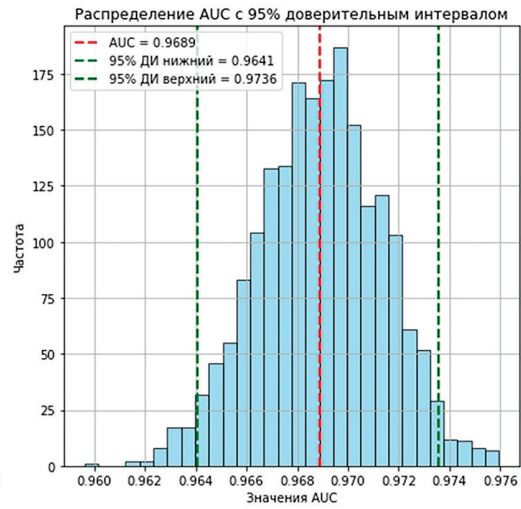
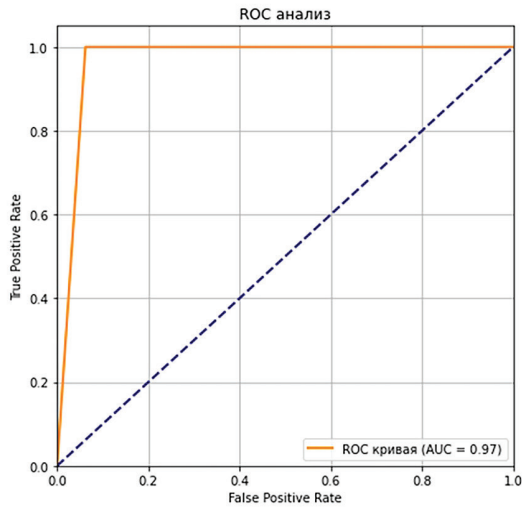
№ 1 — европейский зубр ($n = 28$, BioSample ID — SAMEA114863253, SAMEA115388352, SAMEA115388353, SAMEA115388354, SAMEA115388355, SAMEA115388356, SAMEA115388357, SAMEA115675323, SAMEA5039932, SAMN05000810, SAMN05000811, SAMN05000812, SAMN05950802, SAMN05950803, SAMN05950804, SAMN05950805, SAMN05950806, SAMN05950807, SAMN05950808, SAMN08323717, SAMN08323719, SAMN08323720, SAMN08323722, SAMN08323723, SAMN08323724, SAMN08323725, SAMN08323726, SAMN08323727);

№ 2 — домашний бык ($n = 30$, BioSample ID — SAMEA113983368, SAMEA113983376, SAMEA113983377, SAMEA113983384, SAMEA113983386, SAMEA113983387, SAMEA113983391, SAMEA113983392, SAMEA113983394, SAMEA113983396, SAMEA113983397, SAMEA113983398, SAMEA113983400, SAMEA113983401, SAMEA113983402, SAMEA113983403, SAMEA113983405, SAMEA113983408, SAMEA113983409, SAMEA113983410, SAMEA113983419, SAMEA113983421, SAMEA113983447, SAMEA113983451, SAMEA113983472, SAMEA113983477, SAMEA113983494, SAMEA113983498, SAMEA120322203, SAMEA120322218), — для которых определены генотипы *in silico* с использованием программы GENIS.

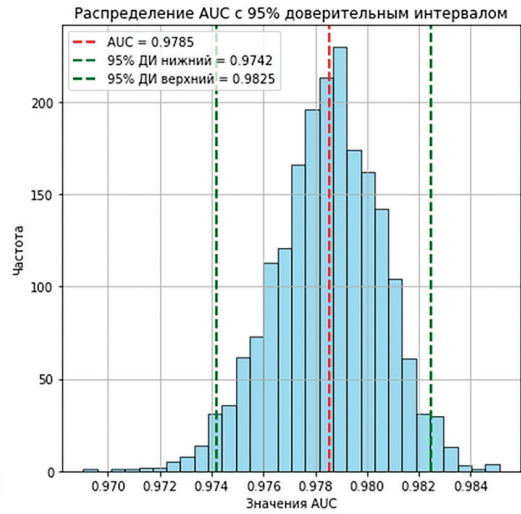
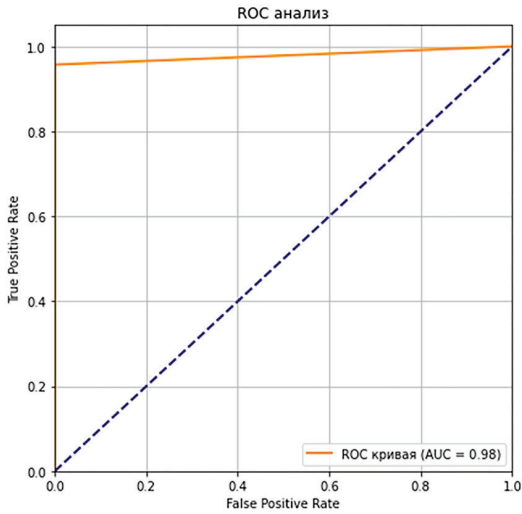
Для первичной оценки информативности SNV (суммарно для 58 образцов) провели ROC-анализ, который выделил четыре полиморфных варианта со значениями $AUC \geq 0,9$: rs41590141, rs110457178, rs41609042, rs110712082.

На втором этапе исследования была расширена выборка с геномами домашнего быка до 2514 образцов, для которых были определены генотипы по четырем SNV, а также проведена итоговая оценка AUC (рис. 1).

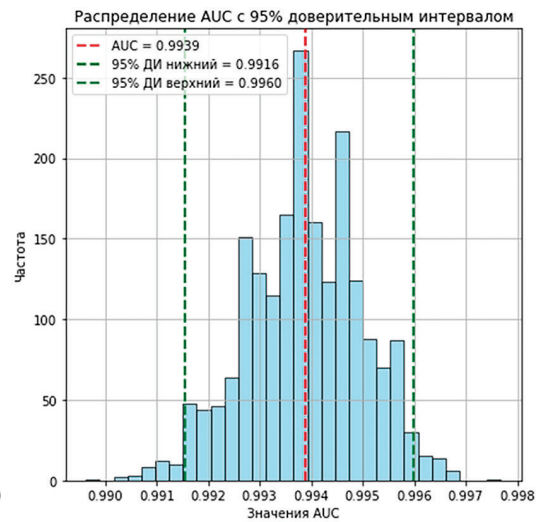
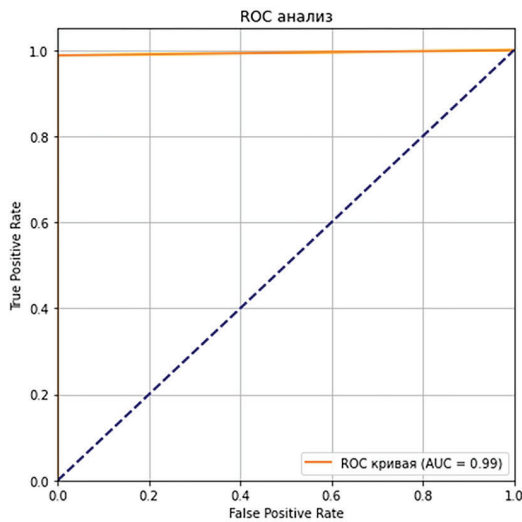
rs41590141



rs110457178



rs41609042



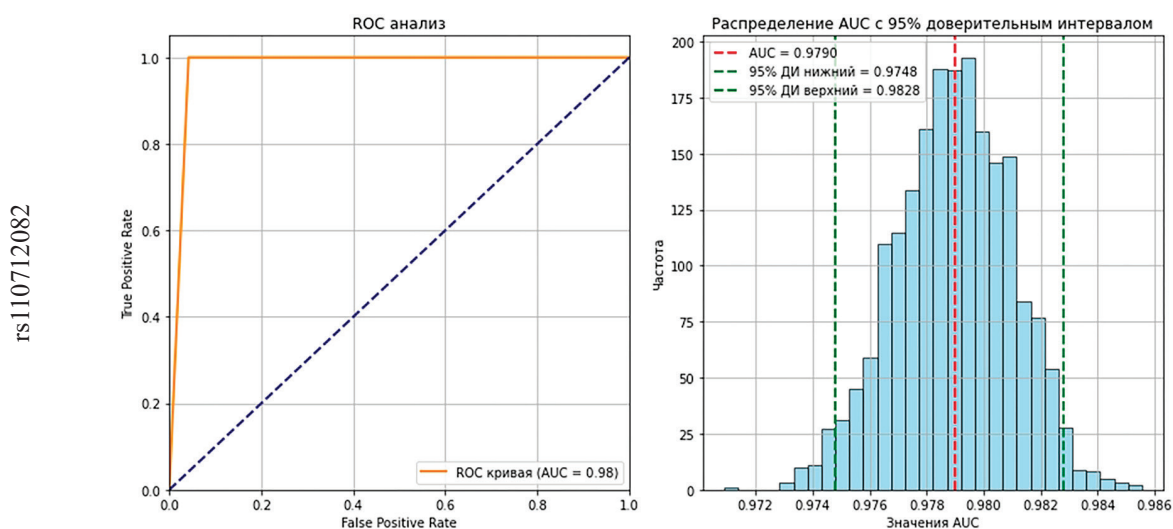


Рис. 1. Результат ROC-анализа для SNV rs41590141, rs110457178, rs41609042, rs110712082. Для каждого SNV приведены ROC-кривая, гистограмма распределения AUC с 95% ДИ.

Далее провели анализ многофакторного сокращения размерности (Multifactor Dimensionality Reduction, MDR) и определили четыре модели с высокими значениями показателей: сбалансированная точность (adj. Balanced accuracy), чувствительность (Sensitivity), специфичность (Specificity), воспроизводимость (CV Consistency), коэффициент Каппа (Cohen's Kappa):

- модель № 1 «rs41590141 / rs110457178 / rs41609042» (суммарное количество образцов — 2231): 0,9983; 1,0; 0,9986; 10/10; 0,9355 соответственно;

- модель № 2 «rs41590141 / rs110457178 / rs110712082» (суммарное количество образцов — 2260): 0,9959; 1,0; 0,9919; 10/10; 0,7462 соответственно;

- модель № 3 «rs41590141 / rs41609042 / rs110712082» (суммарное количество образцов — 2197): 0,9984; 1,0; 0,9982; 10/10; 0,9191 соответственно;

- модель № 4 «rs110457178 / rs41609042 / rs110712082» (суммарное количество образцов — 2218): 0,9974; 1,0; 0,9977; 10/10; 0,9008 соответственно.

Модель № 1 (rs41590141 / rs110457178 / rs41609042) характеризуется наилучшим показателем коэффициента Каппа (Cohen's Kappa) — 93,55%, именно для этой модели далее дано развернутое описание.

При оценке точности отнесения образца к одной из двух групп — домашний бык

(корова) или европейский зубр — с использованием многофакторного сокращения размерности получены данные, представленные в таблице 2.

Три образца *Bos taurus*: SAMN07431010 (порода — Dehong); SAMN42883272 (Xiangxi yellow cattle) и SAMN15514480 (Arsi) — были отнесены к классу *Bison bonasus*. Также девять образцов *Bos taurus*: SAMN19491851 (порода — Tuli), SAMEA114222514 (Creole); SAMN21399885; SAMN15514586 (Horro); SAMN31530321 (Mongolian); SAMN37190826 (Island of Amsterdam); SAMN42883185 (Mongolian); SAMN23291840 (Zhaotong); SAMN04545548 (Ankole) — не были отнесены ни к одному из двух классов с уровнем $p < 0,05$. Таким образом, суммарный процент некорректной классификации для образцов *Bos taurus* составил 0,54% [0,27–0,88%].

Образцы *Bison bonasus* были классифицированы корректно во всех четырех моделях.

Соответственно, среди всего многообразия SNV — более 5 тыс., вовлеченных в биоинформатический анализ, наиболее перспективными для молекулярно-генетических исследований могут быть полиморфные варианты (*Bos taurus* UMD 3.1.1 (GCF_000003055.6)): rs41590141 (Chr.4:77221374A > T), rs110457178 (Chr.12:35189028A > C), rs41609042 (Chr.16:12694384A > G).

Дополнительно определены SNV, расположенные в непосредственной близости от

Таблица 2

Соотносимость между генотипом и принадлежностью образца к одному из двух видов (*Bos taurus* или *Bison bonasus*)

Предсказанный класс	Количество образцов	Генотип rs41609042 / rs41590141 / rs110457178	Распространенность особей с данным генотипом [95% ДИ], %
Истинный класс — <i>Bos taurus</i> (n = 2 209)			
<i>Bos taurus</i>	1592	GG/AA/CC	72,07 [70,25–73,85]
<i>Bos taurus</i>	208	GG/AT/CC	9,42 [8,42–10,45]
<i>Bos taurus</i>	92	GG/AA/AC	4,16 [3,47–4,90]
<i>Bos taurus</i>	57	GG/TT/CC	2,58 [1,97–3,23]
<i>Bos taurus</i>	36	GG/AT/AC	1,63 [1,14–2,17]
<i>Bos taurus</i>	26	AG/AA/CC	1,18 [0,77–1,00]
<i>Bos taurus</i>	21	AG/AT/AC	0,95 [0,60–1,34]
<i>Bos taurus</i>	17	GG/AT/AA	0,77 [0,47–1,11]
<i>Bos taurus</i>	17	GG/TT/AA	0,77 [0,47–1,11]
<i>Bos taurus</i>	17	AG/TT/AC	0,77 [0,47–1,11]
<i>Bos taurus</i>	15	GG/AA/AA	0,68 [0,40–1,01]
<i>Bos taurus</i>	15	GG/TT/AC	0,68 [0,40–1,01]
<i>Bos taurus</i>	15	AG/AT/CC	0,68 [0,40–1,01]
<i>Bos taurus</i>	14	AG/AT/AA	0,63 [0,36–0,95]
<i>Bos taurus</i>	11	AG/AA/AA	0,50 [0,27–0,77]
<i>Bos taurus</i>	11	AG/AA/AC	0,50 [0,27–0,77]
<i>Bos taurus</i>	10	AG/TT/AA	0,45 [0,23–0,72]
<i>Bos taurus</i>	в сумме 23	AA/AT/AA; AG/TT/CC; AA/TT/AC; AA/AT/CC; AA/AA/AC	1,04 [0,78–1,34]
Истинный класс — <i>Bison bonasus</i> (n = 22)			
<i>Bison bonasus</i>	22	AA/TT/AA	100 [99,8–100]

вышеописанных и также обладающие высоким дифференцирующим потенциалом (расположены в порядке возрастания значений хромосомной позиции; жирным шрифтом указаны SNV из модели № 1, описанной выше):

на 4-й хромосоме (*Chr 4 (AC_000161.1)*):

- Chr.4:77221218C > G / AGGTGTTTCA[G/C]AAAGAGAGAA,
- **Chr.4:77221374A > T (rs41590141) / TGAATATCA[T/A]AACCCCTAGGC,**
- Chr.4:77221599C > A / GTACCCAGTC[A/C]AACTACCAAT;

на 12-й хромосоме (*Chr 12 (AC_000169.1)*):

- Chr.12: 35188725A > G (rs432511880) / AAGTTTCAGT[A/G]TCTCTAAATA,
- Chr.12:35188752C > T (rs524291159) / TATTGGCACA[C/T]TGATCTGTGC,
- Chr.12:35188789G > A / AGCAGCAGA[A/G]CCAAGCATGA,

- Chr.12:35188873A > T /

TGGTGACCCC[T/A]GCATTAGATG,

- **Chr.12:35189028A > C (rs110457178) / CCTCTCTTTC[C/A]CAATCAAGTA;**

на 16-й хромосоме (*Chr 16 (AC_000173.1)*):

- Chr.16:12694162C > T (rs41609039) / GAATGATGGA[T/C]GGAGGTTTCAT,
- Chr.16:12694323C > T (rs41609041) / ACCAGAAGCA[C/T]CATAAAAAAT,
- **Chr.16:12694384A > G (rs41609042) / TCTTAAATTC[G/A]TATCTGTGTA,**
- Chr.16:12694545C > T / CTACCGGCAA[C/T]GAGAАСТТТТ.

Биоинформатический анализ геномных данных демонстрирует, что SNV с высоким дифференцирующим потенциалом ($AUC \geq 0,95$), позволяющие надежно разграничивать биологические образцы европейского зубра (*Bison bonasus*) и домашнего быка (*Bos taurus*), пред-

ставлены в геномах обоих видов в достаточном количестве для разработки собственных тест-систем.

В ряде научных исследований были изучены геномы европейского зубра и родственных ему видов, включая американского бизона (*Bison bison*). К. Oleński с соавторами провели исследование чистопородной группы зубров численностью 163 особи, сосредоточившись на решении задачи генетической идентификации животных [5]. М. Wojciechowska и др. проанализировали более обширную выборку, включавшую 455 особей зубров, а также 6 особей американского бизона и одного гибрида (*Bison bonasus* × *Bos taurus*) [6]. О. Kostyunina с соавторами провели молекулярно-генетический анализ групп животных, включавший 8 бизонов, 55 голов КРС (из них 30 особей симментальской породы и 25 — голштинской) и 153 зубров [4]. В работе применяли методы анализа STR и мтДНК, авторы представили график STRUCTURE по результатам STR, однако не привели статистических данных по точности отнесения особей к соответствующим группам. Также в ходе исследований было установлено, что STR локус *BM2113* является мономорфным во всех изученных выборках зубров. В исследовании М. Tokarska с соавторами показано, что анализ отцовства и идентичности на основе STR оказывается неэффективным для европейского зубра из-за низкой гетерозиготности используемых маркеров; это ограничивает практическую применимость подхода для данного вида [13]. При использовании микрочипа BovineSNP50 BeadChip, содержащего более 50 тыс. SNV, выявлено, что у европейского зубра амплифицировались все указанные маркеры, но только менее 2% (960 SNV) оказались полиморфными. Сравнительный анализ генетических маркеров (STR и SNV) продемонстрировал существенные различия в их разрешающей способности. В рамках STR-анализа из 276 генотипов 16% не были уникальными, что указывает на ограниченную эффективность метода. В то же время анализ идентичности с использованием 960 SNV не выявил ни одного случая полного совпадения генотипов среди 50 исследованных животных. Дополнительные эксперименты подтвердили высокую надежность SNV-анализа: при повторном

исследовании с применением наиболее гетерозиготного подмножества SNV либо случайно выбранных SNV не было обнаружено совпадающих генотипов для европейского зубра [13].

Сравнительный анализ разработанной панели с ранее опубликованными методами идентификации европейского зубра демонстрирует ряд существенных преимуществ предложенного подхода. В отличие от панели из 100 SNV, разработанной К. Oleński и др. [5], и мультипанельного подхода М. Wojciechowska с соавторами [6], представленная работа предлагает компактную панель из нескольких высокоинформативных маркеров. Точность разработанной панели подтверждается высоким значением коэффициента Каппа (93,55%), при этом процент некорректной классификации образцов *Bos taurus* составил всего 0,54% [0,27–0,88%]. Методологические преимущества предложенного подхода заключаются в использовании комплексного биоинформатического анализа с применением ROC-анализа и метода многофакторного сокращения размерности (MDR), что позволяет объективно оценивать дифференцирующий потенциал маркеров.

Ограничения метода связаны с необходимостью валидации панели на дополнительных выборках образцов, включая, по возможности, гибридные формы. Также следует учитывать, что эффективность панели может варьироваться в зависимости от популяционной принадлежности исследуемых особей. Сравнительный анализ количества маркеров показывает преимущество предложенного подхода: трехмаркерная панель демонстрирует точность, сопоставимую с более объемными панелями (или превосходящую их), при существенно меньших затратах на проведение анализа. Это особенно важно для рутинной лабораторной практики и криминалистической экспертизы.

В соответствии с действующим законодательством Республики Беларусь, уничтожение зубра, являющегося видом, находящимся под угрозой исчезновения и включенным в Красную книгу страны, влечет за собой особую правовую ответственность. Поскольку зубры находятся под особой охраной государства, их уничтожение квалифицируется не только как причинение ущерба имуществу, но и как деяние, направленное против природных ресур-

сов. В данном случае применяются нормы, предусматривающие более строгое наказание. Дополнительно к уголовной ответственности может быть применена гражданско-правовая ответственность в виде возмещения причиненного ущерба, размер которого определяется с учетом особой ценности уничтоженного животного и его значимости для сохранения вида.

В Беларуси в 2025 г. был зафиксирован случай естественной гибридизации между зубром и коровой [24]. Резонно возникает вопрос: к какому виду отнести животное? И если в опубликованном в СМИ случае наверняка известно, что мать зубробизона являлась корова и животное является гибридом, то в случае отстрела в дикой природе любого другого животного, внешне не отличимого от зубра, невозможно однозначно определить степень правовой ответственности за его уничтожение. Без одновременного анализа мтДНК и ядерных SNV ответ на вопрос о том, какая ответственность наступает в рамках правового поля Беларуси, остается открытым.

Заключение

Проведенное исследование позволило выявить и охарактеризовать информативные однонуклеотидные варианты (SNV), обладающие высоким дискриминирующим потенциалом при дифференциации геномов европейского зубра (*Bison bonasus*) и домашнего быка (*Bos taurus*). В результате комплексного биоинформатического анализа из более чем 5 тыс. исследованных маркеров были отобраны три SNV: rs41590141 (Chr.4:77221374 A > T), rs110457178 (Chr.12:35189028 A > C) и rs41609042 (Chr.16:12694384 A > G), демонстрирующие значительную эффективность при классификации.

Статистическая оценка полученных результатов с использованием ROC-анализа и метода многофакторного сокращения размерности (MDR) подтвердила высокую предсказательную способность выявленных маркеров. Для наилучшей модели дифференциации коэффициент Каппа составил 93,55%, что свидетельствует о практически идеальном согласовании результатов классификации.

Особую ценность представляет выявленный генетический профиль, включающий

как идентифицированные SNV, так и соседние варианты, формирующие характерные паттерны для каждого вида. Это открывает перспективы для дальнейших исследований в области популяционной генетики и сохранения биоразнообразия.

Полученные результаты могут быть использованы в прикладных задачах, включая молекулярную идентификацию видов, изучение генетического разнообразия и разработку методов консервации генофонда редких и исчезающих видов. Предложенные маркеры демонстрируют высокую надежность и могут служить основой для создания специализированных тест-систем.

Таким образом, исследование позволило сформировать научно обоснованную базу для дальнейших генетических исследований и практического применения выявленных маркеров в области зоологии и природоохранной деятельности.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований.

Программное обеспечение GENIS разработано в рамках НИР «Биоинформатический подход к анализу данных полногеномного секвенирования для поиска однонуклеотидных замен, способных дифференцировать близкородственные биологические виды» (рег. № 20231076).

Список использованных источников

1. Результаты учёта зубров в Беловежской пуше в 2025 году: [сайт]. – [Беларусь], 2025. – URL: <https://npbp.by/about/news/resultaty-uchyeta-zubrov-v-belovezhskoy-pushche-v-2025-godu/> (дата обращения: 05.02.2026).

2. О редких и находящихся под угрозой исчезновения видах диких животных и дикорастущих растений, включаемых в Красную книгу Республики Беларусь : постановление Министерства природных ресурсов и охраны окружающей среды Республики Беларусь от 14 марта 2025 г. № 10 // Национальный правовой Интернет-портал Республики Беларусь (дата обращения 05.02.2026).

3. Молекулярно-генетическая идентификация биологических следов диких животных при расследовании дел о незаконной охоте

- в Республике Беларусь / И. С. Цыбовский, С. А. Котова, Т. В. Забавская [и др.] // Теория и практика судебной экспертизы. – 2018. – Т. 13(4). – С. 116–123. – doi: 10.30764/1819-2785-2018-13-4-116-123.
4. Comparative genetic characteristics of the Russian and Belarusian populations of wisent (*Bison bonasus*), north American bison (*Bison bison*) and cattle (*Bos taurus*) / O. V. Kostyunina, M. E. Mikhailova, A. V. Dotsev [et al.] // Cytology and Genetics. – 2020. – Vol. 54(2). – P. 116–123.
5. Subset of SNPs for parental identification in European bison lowland-białowieża line (*Bison bonasus bonasus*) / K. Oleński, S. Kamiński, M. Tokarska, D. M. Hering // Conservation Genetics Resources. – 2017. – Vol. 10(2). – P. 73–78.
6. From wisent to the lab and back again — a complex SNP set for population management as an effective tool in european bison conservation / M. Wojciechowska, K. Puchała, Z. Nowak-Życzyńska [et al.] // Diversity. – 2023. – Vol. 15(1). – P. 116.
7. Polymorphism of bovine microsatellite DNA sequences in the lowland European bison / B. Gralak, M. Krasieńska, C. Niemczewski [et al.] // Acta Theriologica. – 2004. – Vol. 49(4). – P. 449–456.
8. New data on the genetic diversity of European bison (*Bison bonasus*) in Belarus / K. V. Homel, K. Śliwińska, A. A. Valnisty, M. E. Nikiforov // Theriologia Ukrainica. – 2020. – Vol. 19(19). – P. 45–53.
9. Analysis of the genetic diversity of the european bison (*Bison bonasus*) population in Lithuania / R. Lapickis, L. Gričiuvienė, A. Kibiša [et al.] // Diversity. – 2023. – Vol. 15(3). – P. 406.
10. Low level of genetic variability in European bisons (*Bison bonasus*) from the Białowieża National Park in Poland / K. Luenser, J. Fickel, A. Lehnen [et al.] // European Journal of Wildlife Research. – 2005. – Vol. 51(1). – P. 84–87.
11. Genetic diversity of wisent *Bison bonasus* BASED on STR loci analyzed in a large set of samples / W. Olech, M. Wojciechowska, M. Kloch [et al.] // Diversity. – 2023. – Vol. 15(3). – P. 399.
12. Application of bovine microsatellite markers for genetic diversity analysis of European bison (*Bison bonasus*) / T. Roth, I. Pfeiffer, K. Weising, B. Brenig // Journal of Animal Breeding and Genetics. – 2006. – Vol. 123. – P. 406–409.
13. Effectiveness of microsatellite and SNP markers for parentage and identity analysis in species with low genetic diversity: the case of European bison / M. Tokarska, T. Marshall, R. Kowalczyk [et al.] // Heredity. – 2009. – Vol. 103(4). – P. 326–332.
14. Study of allele pool and genetic structure of Russian population of Lowland-Caucasian line of European bison (*Bison bonasus*) / A. V. Dotsev, P. V. Aksenova, V. V. Volkova [et al.] // Ecological genetics. – 2017. – Vol. 15, № 2. – P. 4–10.
15. Михайлова, М. Генетическое разнообразие белорусской популяции европейского зубра / М. Михайлова, Ю. Медведева, А. Буневич // Наука и инновации. – 2011. – № 5(99). – С. 60–62.
16. Применение микросателлитного анализа в генетических исследованиях европейского зубра (*Bison bonasus*) / Н. А. Чурбакова, В. Р. Харзинова, О. А. Кошкина, В. В. Волкова // Генетика и разведение животных. – 2024. – № 1. – С. 5–17.
17. Методика установления видовой принадлежности животных (млекопитающих) Республики Беларусь, находящихся в сфере интереса, на основе технологии ДНК-баркодирования / А. С. Парфёнова [и др.] ; НПЦ Гос. ком. судеб. экспертиз Респ. Беларусь. – Минск, 2024. – 32 с.
18. Кипень, В. Н. Дифференциация волка (*Canis lupus*) и собаки (*Canis lupus familiaris*) на основании результатов биоинформатического анализа геномов / В. Н. Кипень, Е. В. Снытков // Вестник Фонда фундаментальных наук. – 2024. – № 4. – С. 61–68.
19. Кипень, В. Н. Однонуклеотидный полиморфизм для дифференциации образцов дикого кабана и домашней свиньи на основании результатов биоинформатического анализа геномов / В. Н. Кипень, Е. В. Снытков // Вестник Фонда фундаментальных наук. – 2025. – № 1. – С. 107–114.
20. Кипень, В. Н. Однонуклеотидный полиморфизм для дифференциации *Bos taurus* и *Bos grunniens* по данным биоинформатического анализа геномов / В. Н. Кипень, Е. В. Снытков // Молекулярная и прикладная генетика. – 2025. – Т. 38. – С. 123–132.
21. Кипень, В. Н. GENIS — методологический подход для генотипирования *in silico*

(апробация на результатах секвенирования для *Sus scrofa*) / В. Н. Кипень, Е. В. Снытков // Математическая биология и биоинформатика. – 2024. – Т. 19(1). – С. 36–51. – doi: 10.17537/2024.19.36.

22. BovineSNV50 v3.0 [database]. – [USA], 2026. – URL: <https://support.illumina.com/downloads/bovineSNV50-v3-0-product-files.html> (date of access: 05.02.2026).

23. Multifactor-dimensionality reduction

reveals high-order interactions among estrogen-metabolism genes in sporadic breast cancer / M. D. Ritchie, L. W. Hahn, N. Roodi [et al.] // Am. J. Hum. Genet. – 2001. – Vol. 69(1). – P. 138–147. – doi: 10.1086/321276.

24. Корова родила зубренка! Узнали подробности уникального для Беларуси случая: [сайт]. – [Беларусь], 2025. – URL: <https://www.sb.by/articles/ukhazhival-zubr-za-korovoy-.html> (дата обращения: 05.02.2026).

V. N. Kipen

DIFFERENTIATION OF BIOLOGICAL SPECIES *BOS TAURUS* AND *BISON BONASUS* BASED ON BIOINFORMATIC GENOME ANALYSIS RESULTS

State Scientific Institution

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

27 Akademicheskaya St., Minsk 220072, Republic of Belarus

e-mail: v.kipen@igc.by

According to bioinformatic analysis results for 2,542 genomes of the European bison (*Bison bonasus*) and the cattle (*Bos taurus*), single nucleotide polymorphisms (SNV, Single Nucleotide Variant) and their clusters with high discriminatory potential were identified. Based on the statistical analysis, three SNVs were selected as the most informative for differentiating the European bison and cattle (*Bos_taurus_UMD_3.1.1* (GCF_000003055.6)): rs41590141, rs110457178, rs41609042. A model of differentiation of two biological species was also proposed, and prospects for using the model to identify hybrid individuals were discussed.

Keywords: European bison, domestic bull (cow), cattle, polymorphic variant, DNA, genotyping *in silico*, differentiation.

Дата поступления в редакцию: 09 февраля 2026 г.

В. А. Зубарь^{1,2}, Т. В. Семашко¹, А. И. Левданская², Л. А. Жуковская¹

КЛОНИРОВАНИЕ И АНАЛИЗ ГЕНА БИЛИРУБИНОКСИДАЗЫ ШТАММА *ALBIFIMBRIA VERRUCARIA* БИМ F-113 С ПЕРСПЕКТИВОЙ ГЕТЕРОЛОГИЧНОЙ ЭКСПРЕССИИ В КЛЕТКАХ *CORYNEBACTERIUM GLUTAMICUM*

¹Государственное научное учреждение
«Институт микробиологии Национальной академии наук Беларуси»
Республика Беларусь, 220084, г. Минск, ул. Купревича, 2
²Белорусский Государственный Университет
Республика Беларусь, 220030, г. Минск, пр. Независимости, 4
e-mail: lera.zubar@mail.ru

В рамках исследования проведено полногеномное секвенирование штамма *Alb. verrucaria* БИМ F-113. Выявлен ген билирубиноксидазы (2038 п. н., 5 интронов, GC 50%) с гомологией 99,96% к референсной последовательности NCBI (Q12737). Нуклеотидная последовательность кодирует белок из 572 аминокислот и содержащий сигнальный пептид, ключевые медные каталитические центры. Кодонный анализ нуклеотидной последовательности подтвердил отсутствие редких кодонов для *Corynebacterium glutamicum*. Ген успешно клонирован в экспрессионный вектор pEC-XK99E, что позволило получить рекомбинантные штаммы *C. glutamicum*, способные к синтезу билирубиноксидазы.

Ключевые слова: билирубиноксидаза, *Albifimbria verrucaria*, структурный и функциональный анализ гена, генно-инженерные штаммы *Corynebacterium glutamicum*.

Для цитирования: Клонирование и анализ гена билирубиноксидазы штамма *Albifimbria verrucaria* БИМ F-113 с перспективой гетерологичной экспрессии в клетках *Corynebacterium glutamicum* / В. А. Зубарь, Т. В. Семашко, А. И. Левданская, Л. А. Жуковская // Молекулярная и прикладная генетика: сб. науч. тр. / Ин-т генетики и цитологии НАН Беларуси; редкол.: А. В. Кильчевский (гл. ред.) [и др.]. – Минск, 2026. – Т. 40. – С. 64–74.

Введение

Билирубиноксидаза относится к голубым медьсодержащим оксидазам. Данный фермент, наряду с лакказой, аскорбатоксидазой и церулоплазмином, занимает особое место среди окислительно-восстановительных ферментов [1]. Билирубиноксидаза проявляет высокую активность при нейтральном pH и устойчива не только к хлорид-ионам, но и к другим хелаторам, что делает данный фермент идеальным кандидатом для восстановления O₂ в физиологических условиях [2, 3]. Билирубиноксидаза применяется в химической, текстильной, целлюлозно-бумажной, пищевой и косметической промышленности (в органическом синтезе, для детоксикации и обесцвечивания сточных вод, для деградации ксенобиотиков и биоремедиации), при

разработке биосенсоров и катодов биотопливных элементов. Существует возможность ее использования в клинической диагностике (ферментативный метод определения билирубина) [1–8].

Впервые билирубиноксидаза была получена из *Myrothecium verrucaria* (в наст. время *Albifimbria verrucaria*) в 1983 г. Из-за своей коммерческой доступности на сегодняшний день *M. verrucaria* является хорошо изученным видом. Также билирубиноксидаза была выявлена в грибах *Pleurotus ostreatus*, *Trichoderma tsunodae*, *Aspergillus sojae*, *Magnaporthe oryzae*, *Penicillium janthinellum* и бактериях *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* и *Bacillus pumilus*. Имеются сведения о получении продуцентов билирубиноксидаз методами генетической инженерии. В качестве

реципиентов использовали *Aspergillus oryzae*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, *Escherichia coli* [3, 5, 9–10].

В Республике Беларусь исследований билирубиноксидаз, а также работ по конструированию генно-инженерных штаммов микроорганизмов, продуцирующих данный фермент, не проводилось. В Российской Федерации исследования по данной тематике проводятся в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки «Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г. К. Скрыбина Российской академии наук», где был сконструирован генно-инженерный штамм *E. coli* 109/pBP4, экспрессирующий билирубиноксидазу. Полученный фермент используется для количественного определения концентрации общего билирубина [11]. За рубежом также ведутся активные работы по конструированию рекомбинантных штаммов микроорганизмов, экспрессирующих ген билирубиноксидазы, преимущественно в клетках *E. coli*, с целью оптимизации производства фермента [12, 13]. Потребность биотехнологии получения ферментного препарата билирубиноксидазы в высокоактивном продуценте фермента, а также значимые аспекты использования ферментного препарата обуславливают целесообразность проведения исследований по созданию рекомбинантного штамма-продуцента, изучению синтеза фермента, определению его основных свойств и оценке перспективности его практического использования.

Ранее проведен биоинформатический анализ генов микробных билирубиноксидаз Установлено, что среди мицелиальных грибов способностью к синтезу данного фермента обладают штаммы, относящиеся к родам *Albifimbria*, *Colletotrichum*, *Westerdykella*, *Pyricularia*, *Trematosphaeria*, *Pestalotiopsis*, *Alternaria*, *Pyrenophora*, *Pleurotus*, *Ganoderma*, *Lachnellula*, *Neurospora*, *Verticillium*. Из коллекции непатогенных микроорганизмов Института микробиологии НАН Беларуси отобраны штаммы, способные к синтезу билирубиноксидаз. На основании анализа физико-химических свойств ферментов был отобран штамм *Alb. verrucaria* БИМ F-113, образующий билирубиноксидазу с оптимальными свойствами [14].

Цель исследования: клонирование гена билирубиноксидазы штамма *Alb. verrucaria* БИМ F-113 для последующей гетерологической экспрессии в клетках *S. glutamicum*.

Материалы и методы

Объектом исследования являлся штамм гриба *Alb. verrucaria* БИМ F-113, выделенный из коллекции непатогенных микроорганизмов Института микробиологии НАН Беларуси. Культивирование штамма проводилось в жидкой питательной среде Чапека с составом (г/л): сахара — 30; NaNO_3 — 2; K_2HPO_4 — 1; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,5; KCl — 0,5; FeSO_4 — 0,01; в колбах на качалке при перемешивании (180 об/мин) при температуре 25 °С в течение 3–4 суток.

Для биоинформатического анализа использовались нуклеотидные последовательности генов билирубиноксидаз мицелиальных грибов из базы данных NCBI.

Геномную ДНК выделяли методом экстракции с применением реактива СТАВ (setrimonium bromide, цетримониум бромид) [15].

Полногеномное секвенирование штамма *Alb. verrucaria* БИМ F-113 было проведено на базе Института генетики и цитологии НАН Беларуси с использованием платформы MiSeq (Illumina, США). Для эксперимента применялся набор реагентов MiSeq Reagent Kit v3. Все процедуры секвенирования выполнялись согласно утвержденному протоколу.

Обработка и анализ данных осуществлялись на онлайн-платформе Galaxy (<https://usegalaxy.eu>) с применением инструментов FastQC для оценки качества парноконцевых прочтений, PRINSEQ для удаления адаптерных последовательностей и недостоверных ридов, SPAdes для сборки геномных контигов, а также инструмента BRAKER/Augustus для частичной аннотации данных.

Для поиска гена билирубиноксидазы использовали метод выравнивания BLAST против референсного генома и набора известных последовательностей из NCBI. Для поиска редких кодонов в первичной структуре целевого гена для клеток *E. coli* использовали сервис MolBiol [16]. Для анализа частоты встречаемости кодонов в *S. glutamicum* использовали данные из литературных источников [17].

Биоинформатический анализ аминокислотной последовательности белка включал следующие инструменты:

Translate tool — для трансляции нуклеотидной последовательности в белковую;

ProtParam — для расчета физико-химических характеристик;

PeptideCutter — для выявления сайтов действия различных пептидаз;

DeepTMHMM — для предсказания трансмембранных доменов и сигнальных пептидов;

JPred4, SOPMA, Phyre 2.2 — для прогнозирования вторичной структуры белка;

SMART, InterPro (Classification of protein families) — для идентификации консервативных доменов;

WoLF PSORT — для предсказания субклеточной локализации;

trRosetta — для моделирования третичной структуры белка.

Для конструирования вектора и подбора праймеров использовали программу Snapgene 6.2.2. РНК из мицелия гриба *Alb. verrucaria* выделяли по протоколу «Получение РНК дрожжей путем экстракции горячим кислым фенолом» [18]. Получение кодирующих последовательностей осуществлялось с помощью коммерческого набора «ArtMMLV ревертаза», их в дальнейшем использовали для получения кДНК гена билирубиноксидазы. В качестве экспрессионной плазмиды использовали рЕС-ХК99Е. Реакции амплификации гена и линейаризации плазмиды проводили с помощью коммерческого набора «Фьюжн 2.0 полимераза» согласно инструкции производителя. ПЦР-амплификация для линейаризации рЕС-ХК99Е включала в себя следующие режимы: 98 °С — 30 с; 40 циклов (98 °С — 10 с, 61 °С — 10 с, 72 °С — 4 мин); 72 °С — 5 мин; 4 °С — ∞. Сборку вектора, несущего ген билирубиноксидазы, осуществляли методом продолжительной перекрывающейся ПЦР (ПП-ПЦР) в следующем режиме: 98 °С — 30 с; 20 циклов (98 °С — 10 с, 50 °С — 30 с, 72 °С — 5 мин); 72 °С — 5 мин; 4 °С — ∞.

Для переноса вектора, несущего ген билирубиноксидазы, в штаммы бактерий *S. glutamicum* использовался метод сепиолитной трансформации. Для этого 100–300 нг ДНК сконструированного вектора смешива-

ли со 100 мкл трансформирующего раствора (ТЕ-буфер: 10 мМ Трис, 1 мМ ЭДТА, рН 7,6; с сепиолитом: 50 мкг/мл). Отцентрифугированный осадок ночной культуры бактерий *S. glutamicum* ресуспендировали в 100 мкл трансформирующего раствора, смешанного с ДНК вектора, после чего полученную смесь «вortexировали» в течение 20 мин. Далее добавляли 1 мл LB-бульона и в течение 1,5 ч инкубировали при 30 °С на шейкере с перемешиванием (180 об/мин). Затем клетки осаждали центрифугированием (5000 g в течение 5 мин), оставшуюся клеточную суспензию интенсивно втирали с помощью шпателя на поверхность 2% LB-агара с канамицином (25 мкг/мл) в качестве селективного маркера в течение 1 мин, применяя максимальное давление без разрушения агарового геля. В последующем чашки инкубировали в термостате при 30 °С в течение 24 ч. Трансформанты выращивались в жидкой питательной среде при 30 °С в течение 5 ч, после чего для индукции синтеза целевого продукта в среду добавляли 0,5 мМ ИПТГ.

Результаты и обсуждения

Согласно полученным ранее данным, при изучении последовательностей генов мицелиальных грибов, кодирующих билирубиноксидазы, обнаружено, что исследуемые последовательности не имеют между собой значительного сходства. Нуклеотидные последовательности этих генов характеризуются низким уровнем гомологии — в диапазоне 62–75%. При этом в литературе встречаются сведения о различиях в последовательностях генов, влияющих на субстратную специфичность ферментов, а также на их активность в зависимости от рН и температуры [19–21]. Поскольку ферменты, синтезируемые грибами вида *Alb. verrucaria*, обладали более высокой субстратной специфичностью по отношению к билирубину, внимание было сосредоточено на ферментах, синтезируемых этими грибами [19, 22].

Установлено, что штамм *Alb. verrucaria* БИМ F-113, выделенный из коллекции непатогенных микроорганизмов Института микробиологии НАН Беларуси, продуцирует фермент, который обладает высокой активностью в диапазоне рН 5,0–7,0, стабильностью

при температурах от +4 до +28 °С, а также устойчивостью к воздействию хлорид-ионов и других хелаторов, эффективен при определении билирубина в крови крыс [23]. Данный штамм был использован в качестве донора гена, кодирующего билирубиноксидазу.

Необходимость полногеномного секвенирования штамма *Alb. verrucaria* БИМ F-113 с целью выявления гена билирубиноксидазы была обусловлена низкой идентичностью нуклеотидных последовательностей генов данного фермента, представленных в базе данных GenBank NCBI [14].

Выделение ДНК осуществляли из мицелия гриба, полученного путем глубинного культивирования. Методика выделения ДНК из мицелия грибов с помощью СТАВ использовалась без изменений и дала эффективный результат [15]. Концентрация в образцах составила 10,6 и 9,3 нг/мл.

Проведено полногеномное секвенирование штамма *Alb. verrucaria* БИМ F-113. В результате секвенирования было получено 5 714 730 парноконцевых прочтений. После их обработки с целью повышения качества (утилиты PRINSEQ) общее количество прочтений сократилось до 4 241 778. Полученные прочтения были собраны в контиги с использованием сборщика SPAdes, в результате чего было получено 4822 контига. После этого с помощью инструмента BRAKER/Augustus была проведена частичная аннотация данных, чтобы определить расположение экзонов, интронов, а также старт- и стоп-кодонов в геноме.

Частичная аннотация референсного генома *Alb. verrucaria* затрудняла прямой поиск целевого гена, поэтому для его идентификации была выполнена следующая процедура: методом выравнивания с помощью BLAST была определена позиция гена билирубиноксидазы в референсном геноме, после этого контиги были выровнены на найденную последовательность, что позволило локализовать и извлечь искомым ген среди собранных контигов.

Идентифицированный ген длиной 2038 пар нуклеотидов (п. н.) был обнаружен в контиге 42. Применение программы BRAKER/Augustus позволило установить, что ген содержит пять интронных последовательностей, составляющих 15,7% от общего размера гена. Его экзонная часть (CDS — 1719 п. н.) характе-

ризуется 50% GC-составом и кодирует белок, состоящий из 572 аминокислотных остатков, который представляет собой голубую медьсодержащую билирубиноксидазу. Молекулярная масса белка составляет 63 988,78 Да (данное значение отражает массу полипептидной цепи без учета возможных посттрансляционных модификаций и молекулярных добавок).

Ген *Alb. verrucaria* БИМ F-113 значительно короче нуклеотидной последовательности *Myrothecium verrucaria* (D14081.1, 3241 н. п.), несмотря на идентичность кодирующей части (572 а. о., молекулярная масса — 63 947,72 Да для D14081.1). Разница обусловлена интронами меньшего размера (684 н. п. против 1522 н. п.), что свидетельствует о консервативности активных центров, несмотря на полиморфизм некодирующих областей. Полиморфизм интронов затрудняет разработку универсальных праймеров по референсной последовательности из баз данных для амплификации гена билирубиноксидазы.

Ген билирубиноксидазы, идентифицированный в штамме *Alb. verrucaria* БИМ F-113, кодирует белок с идентичностью 99,96% к референсной последовательности *Alb. verrucaria* из базы NCBI (Q12737). Существенное, но более умеренное сходство (59–73%) демонстрируют белки мицелиальных грибов, значительно удаленные друг от друга в эволюционном плане, такие как представители родов *Neonectria*, *Apiospora*, *Cephalotrichum*, *Paramyrothecium*, *Westerdykella*, *Stachybotrys*, *Pyricularia*, *Colletotrichum* и др. (табл. 1).

В аминокислотной последовательности белка содержится единственный остаток цистеина (Cys), что существенно ограничивает потенциальное образование дисульфидных мостиков и влияет на структурную стабильность молекулы. Цистеин (Cys495) входит в состав мотива His494–Cys495–His496, который обеспечивает перенос электронов в медном центре III типа. Отмечается наличие мотивов, необходимых для эффективного окисления субстрата: Trp170–His172, Trp435–His436, Gly431–Asn432–Gly433, однако их расположение значительно отличается от представленных в литературе [21]. Соотношение положительно и отрицательно заряженных аминокислотных остатков свидетельствует о том, что при нейтральном значении pH белок обладает общим

Таблица 1

Сравнительный анализ последовательности билирубиноксидазы штамма *Alb. verrucaria* БИМ F-113 с представленными в базе данных NCBI

Вид микроорганизма	Код доступа	Длина, а. о.	Идентичность, %
<i>Alb. verrucaria</i>	Q12737.1	572	99,65
<i>Paramyothecium foliicola</i>	KAI9172677.1	572	73,34
<i>Cephalotrichum gorgonifer</i>	SPO03603.1	582	69,57
<i>Westerdykella ornata</i>	XP_033652826.1	624	65,6
<i>Apiospora rasikravindrae</i>	KAK8022708.1	640	65,54
<i>Diaporthe sp. PMI_573</i>	KAN8788250.1	634	65,17
<i>Neonectria ditissima</i>	KPM45970.1	616	65,17
<i>Colletotrichum eremochloae</i>	KAK2007728.1	602	65,17
<i>Apiospora arundinis</i>	KAK8848649.1	646	64,54
<i>Paramyothecium foliicola</i>	KAI9158101.1	643	64,41
<i>Seiridium cardinale</i>	KAK9781205.1	737	64,35
<i>Colletotrichum sojae</i>	KAF6794167.1	605	63,99
<i>Lophiotrema nucula</i>	KAF2118746.1	624	63,74
<i>Fusarium floridanum</i>	RSL86628.1	617	63,35
<i>Microdochium nivale</i>	KAJ1336168.1	559	63,33
<i>Rosellinia necatrix</i>	GAP83355.2	626	62,76
<i>Cercophora samala</i>	KAK0663402.1	657	62,14
<i>Triangularia verruculosa</i>	KAK4204631.1	701	61,54
<i>Pyricularia oryzae 70-15</i>	XP_003711412.1	643	59,07

отрицательным зарядом, что соответствует его теоретической изоэлектрической точке (pI) равной 5,16. Температура плавления белка составляет 47,1 °С. Индекс стабильности, равный 37,57, говорит о том, что белок относится к категории стабильных молекул. Значение алифатического индекса составляет 74,67, что указывает на довольно высокую стабильность белка при изменениях температуры. Показатель гидрофобности (GRAVY) равен -0,297, что свидетельствует о преимущественно полярных и гидрофильных свойствах молекулы, делая белок более склонным к растворимости в водной среде.

Вторичная структура белка включает в себя α -спирали (около 3%) и β -спирали (около 34% от общей длины белка) (рис. 1). На N-концевом участке, в пределах аминокислотных остатков с 1 по 22, расположен сигнальный пептид, что типично для белков, ориентированных на се-

крецию из клетки, подтверждая его экзоферментативную природу. Отсутствие трансмембранных доменов указывает на то, что белок не интегрирован в мембрану и является растворимым, что свойственно билирубиноксидазе.

Согласно данным программы SMART, медный центр Cu_3 находится в диапазоне 84–198 а.о., а центр Cu_2 локализован в интервале 376–513 а.о. Это части трехмедного кластера, который играет ключевую роль в катализе окислительных реакций, таких как восстановление кислорода. Cu_3 в сочетании с другими ионами меди обеспечивает электронотранспорт и каталитическую активность [3, 24]. Кроме того, в структуре белка выделен домен SCOP с идентификатором d1kv7a2, охватывающий участок с 203 по 374 а. о., который является эволюционно консервативным и относится к мульти-медным оксидоредуктазам (рис. 2). Однако эти данные противоречат встречаю-

MFKH**TLGAAALSLLFN**SNAVQASFPVETSPATGHLFKRVAQISPOYPMTVPLPIPPVKQPRLLTVTNP
 VNGQE**IWYYEIEIKPFTHQ**VYPDLG**SADLVGYDGMSPGP****TFQVPRGVETVVRFINNAEAPNSVHLHGS**
 FSRAAFD**GWAEDITEPGSFKDY**YYPNRQSART**LWYH**HDHAMHITAENAYRG**QAGLYMLT**DPaedalnlp
 SGYGEFD**IPMILTSKQY**TANG**NLVT**NGELNSFWGD**VIHVNGQPWPFKN**VEPRKYRFR**FILDA**AVSR**SF**
GLYFADTDaIDTRL**PFKVIAS**DSGLLEHP**ADTNLLYI**SMAERYEV**VVDF**SDYAG**KTIELRNL**GGSIGG
 IGTDDYDNTDKV**MRFV**ADDT**TQPD**TSVVANLRD**VFFPSPTTNTPRQ**ER**FRGRTGP****TWTING**VA**FAD**
 VQNR**LLAN**V**PGT****VERWEL**INAGNG**WTHP****IHIHLVDFKVIS**RTSGNNART**VMPY**ESGLKD**VVWL**GRRE
TVVVEAHYAP**FP****GVYMF**CHNLIHEDHDMMA**AFNATV**L**PDY**GYNAT**VFVD**PMEEL**WQAR**PYELGE**FQA**
QSGQFSVQAVTERIQ**TM**AEYR**PYAA**DE

Рис. 1. Схема вторичной структуры билирубиноксидазы. Зеленым цветом обозначены α-спирали (3%), голубым — β-спирали (34%)

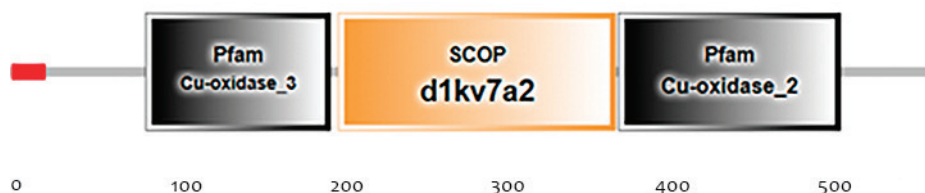


Рис. 2. Топология доменных областей белка билирубиноксидазы штамма *Alb. verrucaria* БИМ F-113 (SMART)

щимся в источниках [21]: согласно наличию аминокислотного мотива His494–Cys495–His496, можно предположить, что медный центр Cu₃ располагается в диапазоне 376–513 а. о. Таким образом, возникает необходимость в дополнительном анализе локализации медных центров, т. к. они являются основопо-

лагающими элементами в ферментативной реакции с участием билирубиноксидазы.

Дополнительный анализ доменной организации, проведенный в базе с помощью программы InterPro с инструментом Classification of protein families (рис. 3), позволил также классифицировать белок как медную оксида-

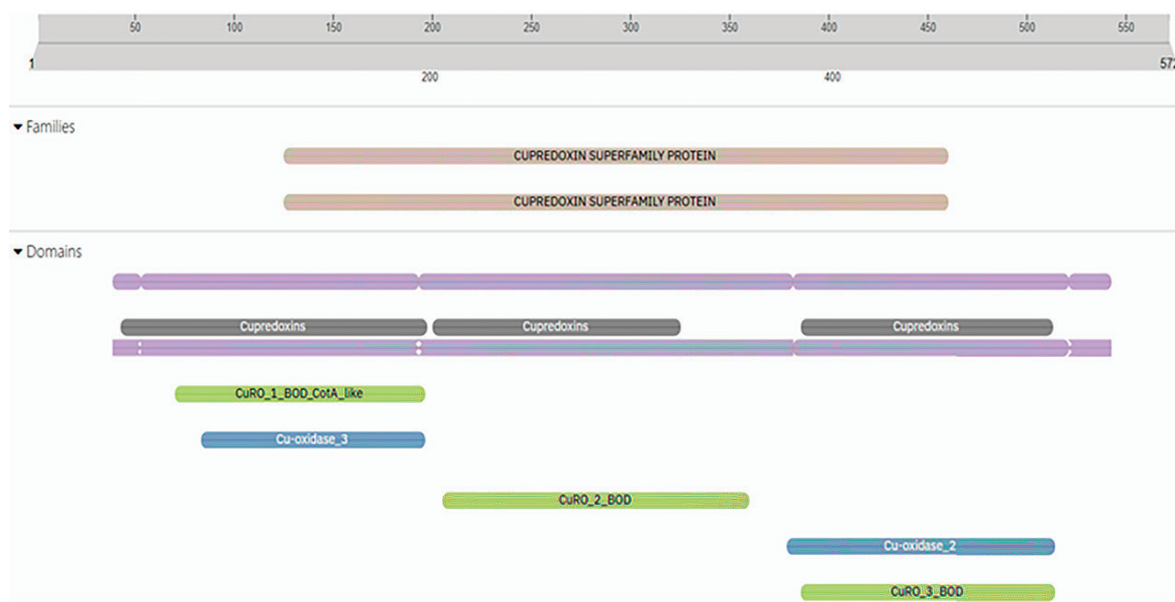


Рис. 3. Топология доменных областей белка билирубиноксидазы штамма *Alb. verrucaria* БИМ F-113 (InterPro)

зу. Серые блоки на схеме обозначают локализацию медных центров, характерных для всех ферментов этого семейства. Зеленые блоки (домены CuRO_BOD) соответствуют медным центрам билирубиноксидазы, что подтверждает литературные данные о положении третьего медного центра.

Результаты анализа выявили основные структурные элементы: домены, соответствующие медному центру 1 (74–197 а. о.), медному центру 2 (207–258 а. о.) и медному центру 3 (385–510 а. о.). Кроме того, предсказано расположение сигнального пептида (1–22 а. о.), совпадающее с данными предыдущей программы.

Таким образом, программа SMART идентифицировала консервативные домены мульти-медных оксидоредуктаз, общие для всех ферментов семейства MCO, тогда как InterProScan обеспечил специфическую аннотацию доменной архитектуры билирубиноксидазы с точной локализацией ее характерных медных центров.

Для сравнения потенциала секреции белка в *E. coli* и *C. glutamicum* проанализировали CDS гена на наличие редких кодонов, которые обуславливают трудности трансляции транскрипта [16]. Отсутствие редких кодонов позволяет предположить возможность синтеза фермента данными микроорганизмами. Однако дополнительный анализ экзонной последовательности позволил обнаружить кодоны, которые более широко используются в высокоэкспрессируемых генах *C. glutamicum* — 13 кодонов, кодирующих 12 аминокислот (Thr (ACC), Pro (CCA), His (CAC), Arg (CGC), Gln (CAG), Asn (AAC), Lys (AAG), Asp (GAC), Glu (GAA), Gly (GGC), Ala (GCC, GCA)). Это позволило остановить выбор на бактериях *C. glutamicum* в качестве реципиента для по-

лучения штаммов-продуцентов билирубиноксидазы [17].

Кроме того, выбор бактерий *C. glutamicum* оправдан рядом других преимуществ: этот микроорганизм не является патогенным, не формирует спор, предъявляет невысокие требования к условиям выращивания и среде, а также отличается высокой природной устойчивостью к токсическим веществам. Геном *C. glutamicum* обладает высокой стабильностью, обусловленной отсутствием системы репарации и рекомбинации *recBCD*. Важным преимуществом данного вида по сравнению с бактериями *E. coli* является отсутствие продукции эндотоксинов, что делает его предпочтительным хозяином для экспрессии ряда белков, в том числе билирубиноксидазы [25–29].

Кодирующая последовательность (CDS) гена билирубиноксидазы синтезирована из полной РНК, полученной из мицелия *Alb. verrucaria* БИМ F-113.

В таблице 2 представлены праймеры для амплификации CDS билирубиноксидазы и линейаризации вектора, на основе которых в программе SnapGene 6.1 был спроектирован рекомбинантный вектор pEC-BOX (базовая плаزمид pEC-ХК99Е, рис. 4).

С использованием праймеров pEC-BOX F/R методом ПЦР (режим 98 °С — 30 с, 40 циклов (98 °С — 10 с, 62 °С — 10 с, 72 °С — 1 мин), 72 °С — 5 мин, 4 °С — ∞) изолирован ген билирубиноксидазы из кодирующей последовательности. На электрофореграмме фрагмент имел размер, соответствующий расчетным (~1750 п. н.).

ПЦР-амплификация с праймерами pEC F/R обеспечила линейаризацию pEC-ХК99Е. Затем методом ПП-ПЦР с линейаризованной плазми-

Таблица 2

Последовательности олигонуклеотидных праймеров для клонирования гена билирубиноксидазы

№	Название	Последовательность
1	pEC F	GGCTGTTTTGGCGGATGAGAGAAGATTTTCAG
2	pEC R	CATGGTCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCT
3	pEC-BOX F	CACAGGAAACAGACCATGATGTTCAAACACACACTTGGAGCTGCTGCC
4	pEC-BOX R	TCATCCGCCAAAACAGCCTTACTCGTCAGCTGCGGCGTAAGGTC

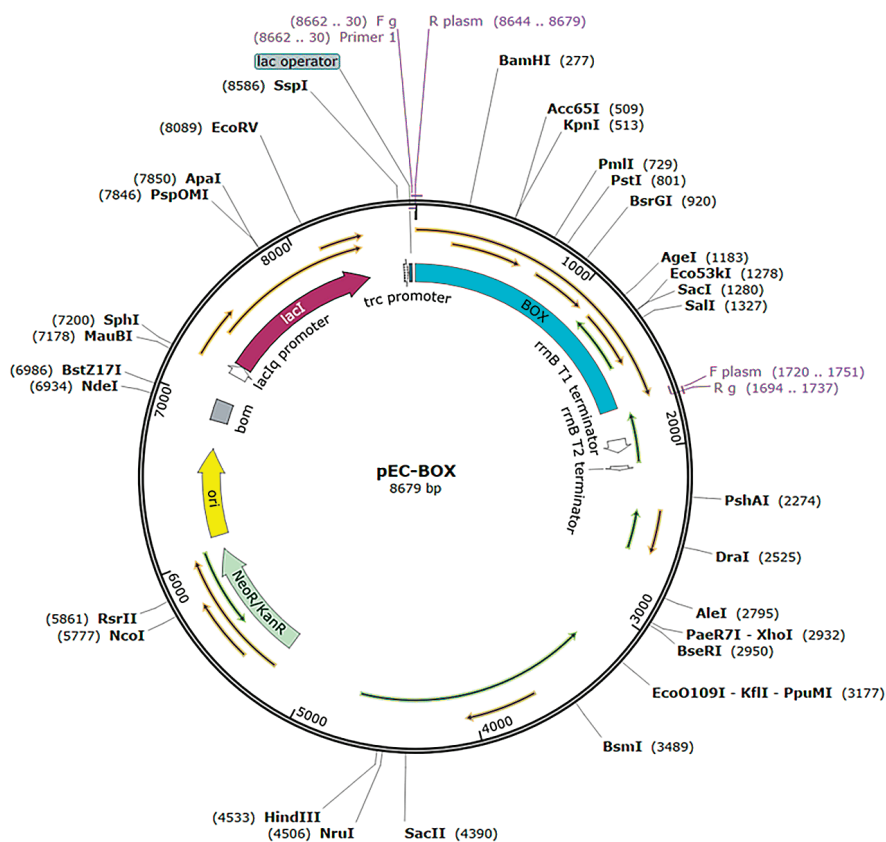


Рис. 4. Схема рекомбинантного вектора pEC-BOX, несущего ген билирубиноксидазы сконструированного в программе SnapGene 6.1

дой pEC-ХК99Е и ампликоном гена билирубиноксидазы получен рекомбинантный вектор pEC-BOX, который методом сепиолитовой трансформации введен в клетки *C. glutamicum* БИМ Б-77 и БИМ Б-78. Эффективность трансформации составила $1 \times 10^2 - 1,5 \times 10^3$ трансформант/мкг ДНК. Присутствие вставки в составе плазмид, выделенных из отобранных трансформантов, доказано методом ПЦР. Полученные трансформанты выращивались в жидкой питательной среде с добавлением ИПТГ для индукции синтеза целевого продукта. В последующем клетки трансформантов *C. glutamicum* обрабатывались индикаторным раствором, содержащим билирубин и о-дианизидин, по появлению коричневой окраски были отобраны клоны, синтезирующие данный фермент.

Заключение

Таким образом, низкая гомология генов билирубиноксидаз мицелиальных грибов (62–75%) и полиморфизм интронов, затруд-

няющие разработку универсальных праймеров, обусловили необходимость полногеномного секвенирования штамма *Alb. verrucaria* БИМ F-113. В результате анализа был идентифицирован ген длиной 2038 п. н., включающий пять интронных последовательностей. Кодированный белок состоит из 572 а. о. с молекулярной массой около 63,9 кДа.

Оценка идентичности выявила высокую степень сходства с известной нуклеотидной последовательностью билирубиноксидазы *Alb. verrucaria*, представленной в базе данных GenBank NCBI. Сравнение показало значительно более низкий уровень идентичности с генами других видов мицелиальных грибов, что отражает эволюционное разнообразие данного фермента.

Комплексный анализ медных центров (InterPro/SMART) позволил более точно предсказать расположение трехмедного кластера: Cu_1 (74–197 а. о.), Cu_2 (207–258 а. о.), Cu_3 (385–510 а. о.). Наблюдаемые расхождения в предсказаниях обусловлены методоло-

гическими различиями: программа SMART идентифицировала консервативные домены мульти-медных оксидоредуктаз, характерные для всего семейства MCO, в то время как InterProScan обеспечил специфическую аннотацию доменной архитектуры билирубиноксидазы с высокой точностью локализации ее функциональных медных центров.

Анализ кодонной частоты CDS гена показал отсутствие редких кодонов для *C. glutamicum*. Применение ПП-ПЦР с использованием праймеров, содержащих гомологичные последовательности, позволило сконструировать экспрессионный вектор рЕС-BOX на основе плазмиды рЕС-ХК99Е. Сепиолитная трансформация *C. glutamicum* полученной конструкцией подтвердила функциональность конструкции. Полученные результаты демонстрируют возможности применения *C. glutamicum* для гетерологичного синтеза билирубиноксидазы, однако необходимы дальнейшие исследования по оптимизации условий экспрессии и изучению активности синтезируемого фермента.

Работа выполнялась в рамках НИР «Получение рекомбинантного микробного штамма-продуцента билирубиноксидазы как основы тест-систем для детекции билирубина и электродов биотопливных элементов». Договор с БРФФИ № Б25МП-020 от 02.05.2025 г.

Авторы выражают благодарность кандидату биологических наук, заведующему сектором биоинформатики О. Д. Левданскому за содействие в проведении полногеномного секвенирования.

Список использованных источников

1. Bilirubin oxidase from *Magnaporthe oryzae*: an attractive new enzyme for biotechnological applications / F. Durand, S. Gounel, C. H. Kjaergaard [et al.] // *Applied Microbiol Biotechnol.* – 2012. – Vol. 96, № 6. – P. 1489–1498.
2. Mano, N. Features and applications of bilirubin oxidases // *Applied Microbiol Biotechnol.* – 2012. – Vol. 96, № 2. – P. 301–307.
3. Structural Changes of the Trinuclear Copper Center in Bilirubin Oxidase upon Reduction / T. Tokiwa, M. Shoji, V. Sladek [et al.] // *Molecules.* – 2018. – Vol. 24, № 1. – P. 76.
4. Походня, Ю. Г. Использование билирубиноксидазы из гриба *Pleurotus ostreatus* в экологической биотехнологии / Ю. Г. Походня, А. Г. Лапко // *Экологический вестник.* – 2010. – № 3. – С. 29–40.
5. Походня, Ю. Г. Выделение и характеристика фермента, обладающего билирубиноксидазной и лакказной активностью, из мицелия базидиального гриба *Pleurotus ostreatus* / Ю. Г. Походня, Н. И. Малиновский, А. Г. Лапко // *Биохимия.* – 2009. – Т. 74, Вып. 9. – С. 1260–1269.
6. Bioelectrocatalytic reduction of dioxygen to water at neutral pH using bilirubin oxidase as an enzyme and 2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonate) as an electron transfer mediator / S. Tsujimura, H. Tatsumi, J. Ogawa [et al.] // *Journal of Electroanalytical Chemistry.* – 2001. – № 496. – P. 69–75.
7. Ikeda, T. An electrochemical approach to the studies of biological re-dox reactions and their applications to biosensors, bioreactors, and biofuel cells / T. Ikeda, K. Kano // *J. Biosci and Bioeng.* – 2001. – № 92. – P. 9–18.
8. Tsujimura, S. From fundamentals to applications of bioelectrocatalysis: bioelectrocatalytic reactions of FAD-dependent glucose dehydrogenase and bilirubin oxidase / S. Tsujimura // *Biosci Biotechnol Biochem.* – 2019. – Vol. 83, № 1. – P. 39–48.
9. Purification, characterization and decolorization of bilirubin oxidase from *Myrothecium verrucaria* 3.2190 / X. Han, M. Zhao, L. Lu [et al.] // *Fungal Biology.* – 2012. – Vol. 116, № 8. – P. 863–871.
10. High-level expression of *Myrothecium verrucaria* bilirubin oxidase in *Pichia pastoris*, and its facile purification and characterization / K. Kataoka, K. Tanaka, Y. Sakai [et al.] // *Protein Expr Purif.* – 2005. – Vol. 41, № 1. – P. 77–83.
11. Фотометрический способ определения концентрации общего билирубина в сыворотке крови с помощью бактериальной оксидазы из *Bacillus pumilus*: пат RU2418072C1 РФ, МПК C12Q 1/26 / И. Л. Глухов; В. В. Шматченко, А. А. Леонтьевский; заявитель Федеральное государственное учреждение «Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г. К. Скрыбина Российской академии наук». – № 2010113334/10,; заявл. 07.04.2010; опубл. 10.05.2011, Бюл. № 13 // *НЭБ:*

Патент на изобретение. https://rusneb.ru/catalog/000224_000128_0002418072_20110510_C1_RU/.

12. Kimura, N. Thermostable Bilirubin-Oxidizing Enzyme from Activated Sludge Isolated by a Metagenomic Approach / N. Kimura, Y. A. Kamagata // *Microbes Environ.* – 2016. – Vol. 31, № 4. – P. 435–441.

13. Heterologous expression and characterization of a bilirubin oxidase gene from *Myrothecium verrucaria* in *Arabidopsis thaliana* / H. Feng, M. Wang, B. Wang [et al.] // *Biotechnology & Biotechnological Equipment.* – 2020. – Vol. 34, № 1. – P. 421–429.

14. Сравнительный анализ методов скрининга штаммов микроорганизмов, синтезирующих билирубиноксидазы / Т. В. Семашко, В. А. Зубарь, Л. А. Жуковская [и др.] // *Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты: сб. науч. тр.* 2023. – Т. 15. – С. 147–159.

15. Оптимизация условий выделения ДНК из грибов рода *Aspergillus* для последующей молекулярно-генетической идентификации / И. А. Гончарова, А. А. Арашкова, О. В. Евдокимова [и др.] // *Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты: сб. науч. тр.* – 2016. – Т. 8. – С. 62–72.

16. Хайруллин, Р. Ф. Экспрессия рекомбинантных белков в *E.coli*: учеб. пособие. / Р. Ф. Хайруллин, Р. Г. Киямова, А. А. Ризванов. – Казань: Издательство Казанского университета, 2018. – 142 с.

17. Codon Usage Patterns in *Corynebacterium glutamicum*: Mutational Bias, Natural Selection and Amino Acid Conservation / G. Liu, J. Wu, H. Yang [et al.] // *Comp Funct Genomics.* – 2010. – Vol. 2010. – P. 343569.

18. Collart, M. A. Preparation of yeast RNA / M. A. Collart, S. Oliviero // *Curr Protoc Mol Biol.* – 2001. – Vol. 13. – P. 13.12.1–13.12.5.

19. Mano, N. Bilirubin oxidases in bioelectrochemistry: features and recent findings / N. Mano, L. Edembe // *Biosens Bioelectron.* – 2013. – Vol. 50. – P. 478–485.

20. Bilirubin oxidase from *Bacillus pumilus*: a promising enzyme for the elaboration of efficient cathodes in biofuel cells / F. Durand, C. H. Kjaergaard, E. Suraniti [et al.] // *Biosens Bioelectron.* – 2012. – Vol. 35, № 1. – P. 140–146.

21. Trp-His covalent adduct in bilirubin oxi-

dase is crucial for effective bilirubin binding but has a minor role in electron transfer / T. Koval', L. Švecová, L. H. Østergaard [et al.] // *Sci Rep.* – 2019. – Vol. 9, № 1. – P. 13 700.

22. Билирубиноксидаза *Albifimbria verrucaria* БИМ F-113: характеристика белка и кодирующего его гена / В. А. Зубарь, Т. В. Семашко, А. И. Левданская // *Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты: материалы XIV Междунар. науч. конф. (Минск, 2–7 июня 2025 г.).* – 2025. – С. 304–305.

23. Bilirubin oxidases of mycelial fungi: production and properties / V. A. Zubar, T. W. Semashko, L. A. Zhukouskaya // *Microbiology higher education in Mongolia – 80 years: International scientific conference (Ulaanbaatar 29 Nov. 2024).* – 2024. – P. 82–83.

24. Пономарева, О. Н. Электрохимическое сопряжение медьсодержащих оксидаз в биосенсорах и биотопливных элементах: выбор методов и подходов / О. Н. Пономарева // *Известия Тульского государственного университета. Естественные науки.* – 2022. – № 4. – С. 33–41.

25. Development and application of a membrane cyclone reactor for in vivo NMR spectroscopy with high microbial cell densities / A. Hartbrich, G. Schmitz, D. Weuster-Botz [et al.] // *Biotechnol Bioeng.* – 1996. – Vol. 51, № 6. – P. 624–635.

26. Metabolic engineering of industrial platform microorganisms for biorefinery applications – optimization of substrate spectrum and process robustness by rational and evolutive strategies / N. Buschke, R. Schäfer, J. Becker [et al.] // *Biour Sour Technol.* – 2013. – Vol. 135. – P. 544–554.

27. The genome stability in *Corynebacterium* species due to lack of the recombinational repair system / Y. Nakamura, Y. Nishio, K. Ikeo [et al.] // *Gene.* – 2003. – Vol. 317, № 1–2. – P. 149–155.

28. Engineered *Corynebacterium glutamicum* as an endotoxin-free platform strain for lactate-based polyester production / Y. Song, K. Matsumoto, M. Yamada [et al.] // *Appl Microbiol Biotechnol.* – 2012. – Vol. 93, № 5. – P. 1917–1925.

29. Protein secretion in *Corynebacterium glutamicum* / X. Liu, W. Zhang, Z. Zhao [et al.] // *Crit Rev Biotechnol.* – 2017. – Vol. 37, № 4. – P. 541–551.

V. A. Zubar^{1,2}, T. V. Semashko¹, A. I. Levdanskaya², L. A. Zhukovskaya¹

**CLONING AND ANALYSIS OF BILIRUBIN OXIDASE OF
THE *ALBIFIMBRIA VERRUCARIA* STRAIN BIM F-113 WITH
THE PROSPECT OF HETEROLOGOUS EXPRESSION
IN *CORYNEBACTERIUM GLUTAMICUM* CELLS**

¹State Scientific Institution

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

2 Kuprevich St., Minsk 220084, Republic of Belarus

²Belarusian State University

4 Nezavisimosti Ave., Minsk 220030, Republic of Belarus

e-mail: lera.zubar@mail.ru

As part of the study, the whole-genome sequencing of the strain *Alb. verrucaria* BIM F-113 was carried out. The bilirubin oxidase gene (2038 bp, 5 introns, GC 50%) was detected with a 99.96% homology to the reference sequence NCBI (Q12737). The nucleotide sequence encodes a protein consisting of 572 amino acids and containing a signal peptide, key copper catalytic centers. Codon analysis of the nucleotide sequence confirmed the absence of rare codons for *Corynebacterium glutamicum*. The gene was successfully cloned into the expression vector pEC-XK99E, which allowed obtaining recombinant strains of *C. glutamicum* capable of bilirubin oxidase synthesis.

Keywords: bilirubin oxidase, *Albifimbria verrucaria*, structural and functional analysis of the gene, genetic engineering strains of *Corynebacterium glutamicum*.

Дата поступления в редакцию: 06 февраля 2026 г.

О. Д. Левданский, А. М. Молчун

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ПРОГРАММНОГО ОБЕСПЕЧЕНИЯ ДЛЯ ВЫРАВНИВАНИЯ НА РЕФЕРЕНСНУЮ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ И ВЫЗОВА ВАРИАНТОВ

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

В рамках исследования было проведено выравнивание на референсную последовательность (BWA-MEM, BWA-MEM2, Bowtie2 и Minimap2) с последующим вызовом вариантов (FreeBayes, GATK4 и Samtools + Bcftools) для 64 образцов данных NGS экзомных последовательностей человека, после чего были определены параметры качества и времени выполнения для каждой из комбинаций программ. Наиболее высокие показатели качества и количества полученных вариантов были продемонстрированы при использовании GATK4 HaplotypeCaller с BWA-MEM и BWA-MEM2, однако эти комбинации оказались наименее экономичными по времени. Наиболее быстрой комбинацией оказалось сочетание BWA-MEM2 и BCFtools.

Ключевые слова: высокопроизводительное секвенирование, выравнивание на референсную последовательность, вызов вариантов, экзомное секвенирование, биоинформатика.

Для цитирования: Левданский, О. Д. Сравнительный анализ программного обеспечения для выравнивания на референсную последовательность и вызова вариантов / О. Д. Левданский, А. М. Молчун // Молекулярная и прикладная генетика: сб. науч. тр. / Ин-т генетики и цитологии НАН Беларуси; редкол.: А. В. Кильчевский (гл. ред.) [и др.]. – Минск, 2026. – Т. 40. – С. 75–81.

Введение

Возникновение и последовавшее бурное развитие технологий высокопроизводительного секвенирования (NGS) сделали их одним из самых широко распространенных методов в молекулярно-генетических исследованиях. Постоянный рост производительности и уменьшение относительной стоимости секвенирования привели к тому, что NGS стало не только универсальным инструментом для ученых, но и находит все более широкое применение в ряде других сфер деятельности, особенно в здравоохранении. Возможность проводить секвенирование одновременно тысяч генов внесла неоценимый вклад в развитие персонализированной медицины. Столь высокая востребованность NGS обусловила то, что данные с его результатами накапливаются экспоненциально, и это не могло не привести к соответствующему развитию инструментария для их обработки. Это стало причиной того, что на данный момент существует це-

лый ряд широко используемых программ для каждого из этапов обработки данных. Несмотря на то что все это программное обеспечение позволяет достигать одной и той же цели, в основе разных программ лежат различные алгоритмы, что приводит к различиям в получаемых результатах. Это, в свою очередь, обуславливает высокую актуальность поиска наиболее подходящих программ для решения тех или иных задач [1, 2].

Одной из наиболее частых задач, для решения которых применяется NGS, является поиск однонуклеотидных вариантов и/или коротких инсерций и делеций, повлекших за собой развитие того или иного фенотипа. Вне зависимости от масштаба мишени секвенирования (панель генов, экзом, геном) обработка таких данных, помимо прочих, включает два основных этапа: выравнивание на референсный геном и вызов вариантов. В рамках данной статьи было проведено сравнение наиболее широко используемого программного

обеспечения, позволяющего осуществлять данные операции, с целью выбора оптимального набора.

Материалы и методы

В данное исследование были включены результаты высокопроизводительного секвенирования экзомных последовательностей 64 образцов ДНК человека, полученные на приборе NextSeq (Illumina).

Анализ качества прочтений с последующим триммингом некачественных оснований проводили в программах FastQC (v0.11.9) [3] и Trimmomatic (v0.39) [4] соответственно. Выравнивание прочтений на референсный геном (GRCh37) осуществлялось с применением программ BWA-MEM (v0.7.17-r1188) [5], BWA-MEM2 (v2.2.1) [6], Bowtie2 (v2.4.4) [7] и Minimap2 (v2.24-r1122) [8]. Для вызова вариантов были использованы FreeBayes (v1.3.9) [9], GATK HaplotypeCaller (v4.1.8.1) [10] и Samtools + Vcftools (v1.21) [11]. Основные параметры для сравнения: количество вызванных вариантов, среднее качество ва-

риантов, медиана качества вариантов, а также время выполнения. Количество потоков при запуске программ — 72 (объем оперативной памяти — 256 Гб). Обработка всех образцов осуществлялась с применением одного и того же пайплайна.

Все использованные для обработки и анализа данных скрипты доступны по ссылке [12].

Результаты и обсуждение

Качество прочтений во всех исследуемых образцах было проанализировано с помощью программы FastQC. Затем были проведены тримминг и фильтрация прочтений по качеству и длине с последующей повторной проверкой качества. На рисунке 1 представлены полученные количества прочтений для каждого из образцов после фильтрации. После проведения всех этапов обработки каждой из комбинаций программ были выявлены образцы, для которых результаты значительно отклонялись от средних (так называемые выбросы, всего 16 шт.); такие образцы были исключены из итоговых результатов.

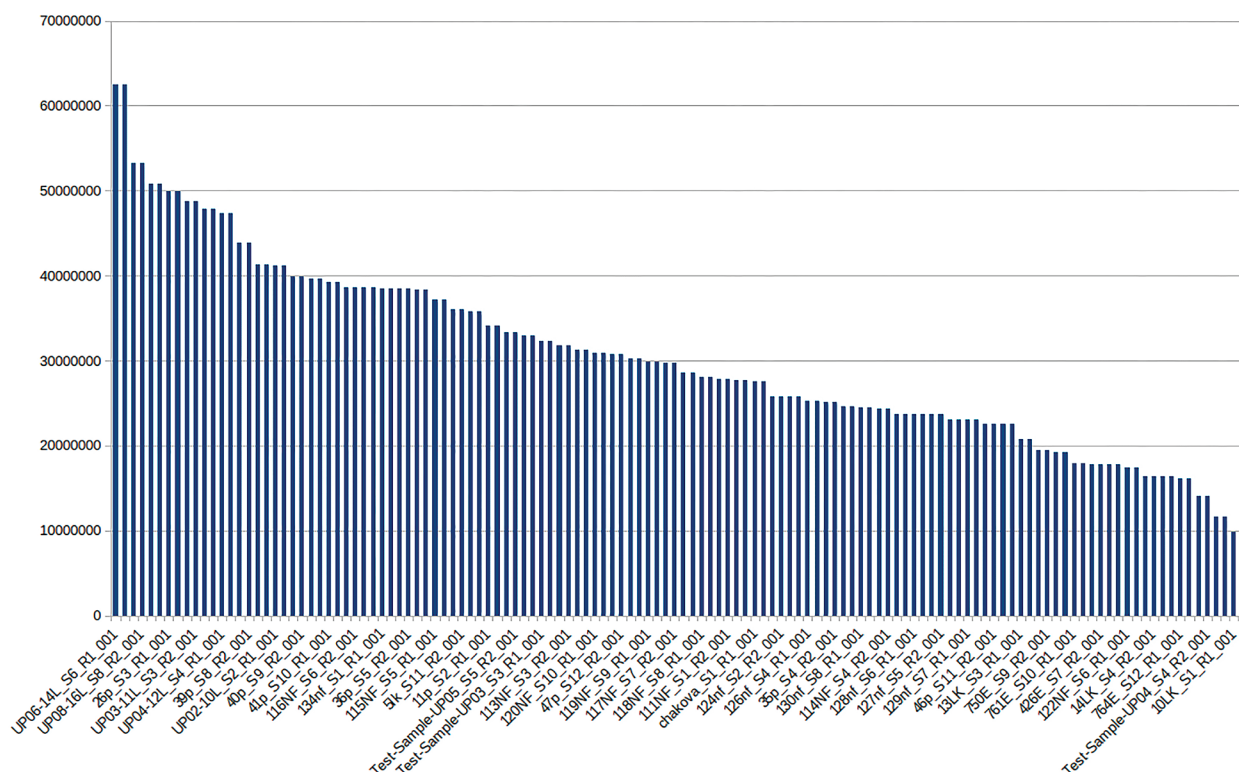


Рис. 1. Количество прочтений, полученных в результате высокопроизводительного секвенирования исследуемых образцов ДНК (ось X — исследованные образцы; ось Y — количество прочтений, результаты отсортированы по убыванию числу прочтений)

Основные показатели эффективности выравнивания с использованием программ Bowtie2, BWA-MEM, BWA-MEM2 и Minimap2, а также затраченное на него время представлены в таблице 1. Как видно из таблицы, наиболее высокие показатели эффективности, кроме процента покрытия мишени, оказавшегося практически одинаковым для всех программ, были продемонстрированы программой Minimap2. Для данной программы средняя глубина покрытия составила $22,5 \pm 4,9$, процент покрытия мишени — $88,7 \pm 9,2$ и суммарное количество выравненных про-

чтений — $78,2 \pm 27$. При этом показатели для конкретных образцов для программы Minimap2 также превосходили таковые для других программ практически для всех образцов. Столь высокое количество выравненных прочтений при сопоставимом показателе покрытия мишени и незначительном увеличении глубины покрытия свидетельствует о высокой доле прочтений, картированных на нецелевые участки генома. Остальные программы продемонстрировали весьма близкие показатели эффективности, при этом показатели BWA-MEM и BWA-MEM2 оказались идентичными.

Таблица 1

Основные показатели эффективности и времени выравнивания прочтений на референсную последовательность с помощью исследуемых программ (среднее значение \pm стандартное отклонение)

Программа	Время, с	Глубина покрытия	Покрытие мишени, %	Количество прочтений, млн
Bowtie2	$347,7 \pm 106,5$	$20,7 \pm 4,2$	$88,7 \pm 9,3$	$54,4 \pm 17,6$
BWA-MEM	$237,4 \pm 66,4$	$20,5 \pm 4,2$	$88,8 \pm 9,0$	$54,9 \pm 17,7$
BWA-MEM2	$216,0 \pm 58,3$	$20,5 \pm 4,2$	$88,8 \pm 9,0$	$54,9 \pm 17,7$
Minimap2	$242,6 \pm 47,2$	$22,5 \pm 4,9$	$88,7 \pm 9,2$	$78,2 \pm 27,7$

Что касается времени, затраченного на выравнивание, то оно оказалось наименьшим для программы BWA-MEM2. Наиболее затратным по времени оказалось выравнивание с помощью программы Bowtie2.

В таблице 2 приведены основные показатели эффективности вызова вариантов, а также суммарного времени, затраченного на выравнивание на референсную последовательность и вызов вариантов, с помощью сравниваемого программного обеспечения.

Исходя из результатов, наибольшее количество вариантов было получено с помощью GATK4 вне зависимости от применявшегося для выравнивания программного обеспечения с максимальным показателем в $80,2 \pm 18,4$ тыс. в комбинации с BWA-MEM и BWA-MEM2. Наименьшее количество вариантов было выявлено с помощью комбинации Minimap2 и FreeBayes ($40,9 \pm 11,0$), при этом для Minimap2 количество вариантов было ми-

нимальным у каждой из программ для вызова вариантов (рис. 2). Учитывая максимальные показатели эффективности выравнивания с помощью данной программы, это может свидетельствовать о его более мягких критериях. Это, в свою очередь, приводит к тому, что многие прочтения выравниваются некорректно и в конечном итоге дают ложноположительные варианты, которые затем отсеиваются при фильтрации.

Наивысший параметр среднего качества полученных вариантов продемонстрировал также GATK4 в сочетании с BWA-MEM и BWA-MEM2 ($814,5 \pm 143,4$). Как и в случае с количеством вариантов, данный показатель у GATK4 был максимальным для каждой из программ выравнивания в отдельности. Наименьшее среднее качество вариантов было обнаружено для Minimap2 в комбинации с VCFTools ($126,3 \pm 6,2$), что также свидетельствует в пользу того, что Minimap2 вызывает

Таблица 2

Основные показатели эффективности вызова вариантов и суммарного времени (выравнивание + вызов вариантов) с помощью исследуемых программ (среднее значение \pm стандартное отклонение)

Программа вызова вариантов	Модуль выравнивания	Время, с	Количество вариантов, тыс.	Качество вариантов
BCFtools	Bowtie2	1866,6 \pm 620,6	65,5 \pm 15,3	157,4 \pm 2,6
	BWA-MEM	1884,0 \pm 640,5	71,3 \pm 16,9	162,0 \pm 2,8
	BWA-MEM 2	1848,2 \pm 630,9	71,3 \pm 16,9	162,0 \pm 2,8
	Minimap2	1933,3 \pm 683,0	44,1 \pm 11,5	126,3 \pm 6,2
FreeBayes	Bowtie2	2485,4 \pm 673,8	70,4 \pm 17,3	563,8 \pm 88,9
	BWA-MEM	2308,7 \pm 599,0	70,0 \pm 16,5	646,8 \pm 119,8
	BWA-MEM 2	2350,2 \pm 590,9	70,0 \pm 16,5	646,8 \pm 119,8
	Minimap2	2261,6 \pm 594,9	40,9 \pm 11,0	257,4 \pm 31,3
GATK4	Bowtie2	3941,9 \pm 1510,6	71,1 \pm 16,4	796,3 \pm 135,5
	BWA-MEM	4961,6 \pm 2102,1	80,2 \pm 18,4	814,5 \pm 143,4
	BWA-MEM 2	4920,4 \pm 2041,2	80,2 \pm 18,4	814,5 \pm 143,4
	Minimap2	2320,6 \pm 517,9	45,3 \pm 12,1	333,2 \pm 44,6

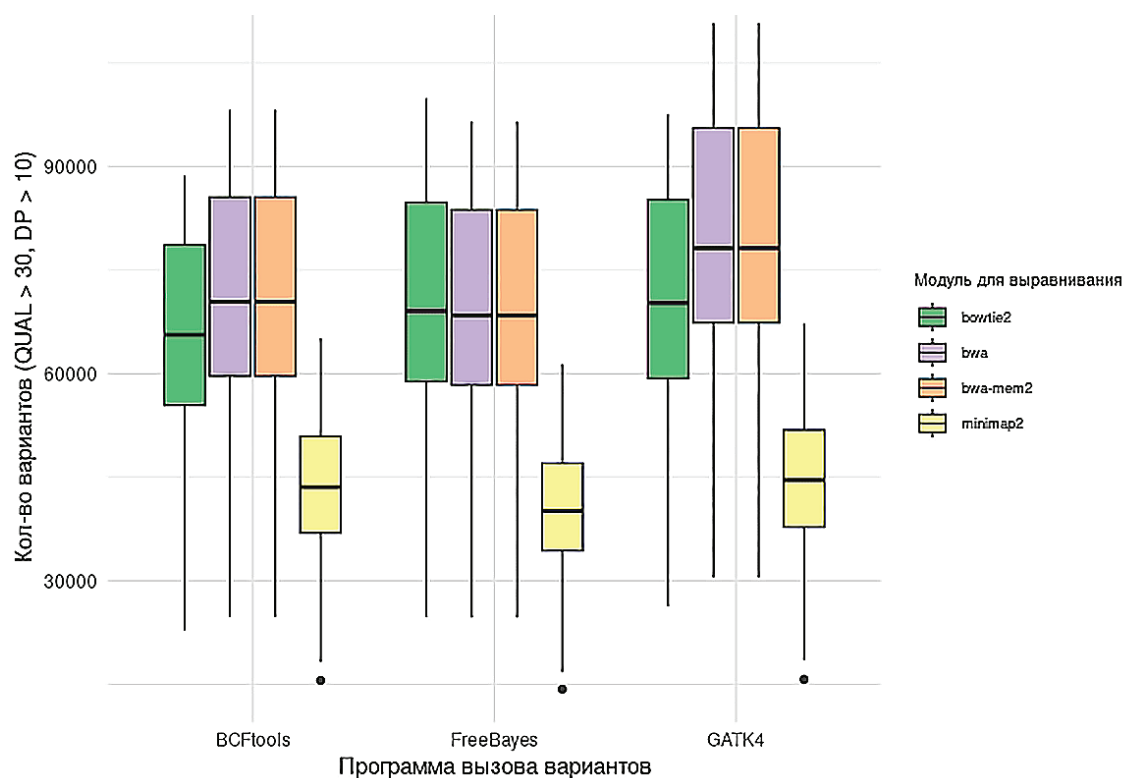


Рис. 2. Количество полученных вариантов

слишком много вариантов с низким качеством.

Самым быстрым инструментом для вызова вариантов оказался BCFtools, вне зависимости от использованной для выравнивания программы, с минимумом в $1848,2 \pm 630,9$ с, показанным в сочетании с BWA-MEM2. При этом BWA-MEM и BWA-MEM2 вошли в комбинации с наиболее длительным временем выполнения

обработки (вместе с GATK4) — $4961,6 \pm 2102,1$ и $4920,4 \pm 2041,2$ с соответственно, что, возможно, связано с максимальным числом вариантов именно для этих комбинаций. В целом, GATK4 показал самые высокие временные затраты среди прочих программ для вызова вариантов (рис. 3).

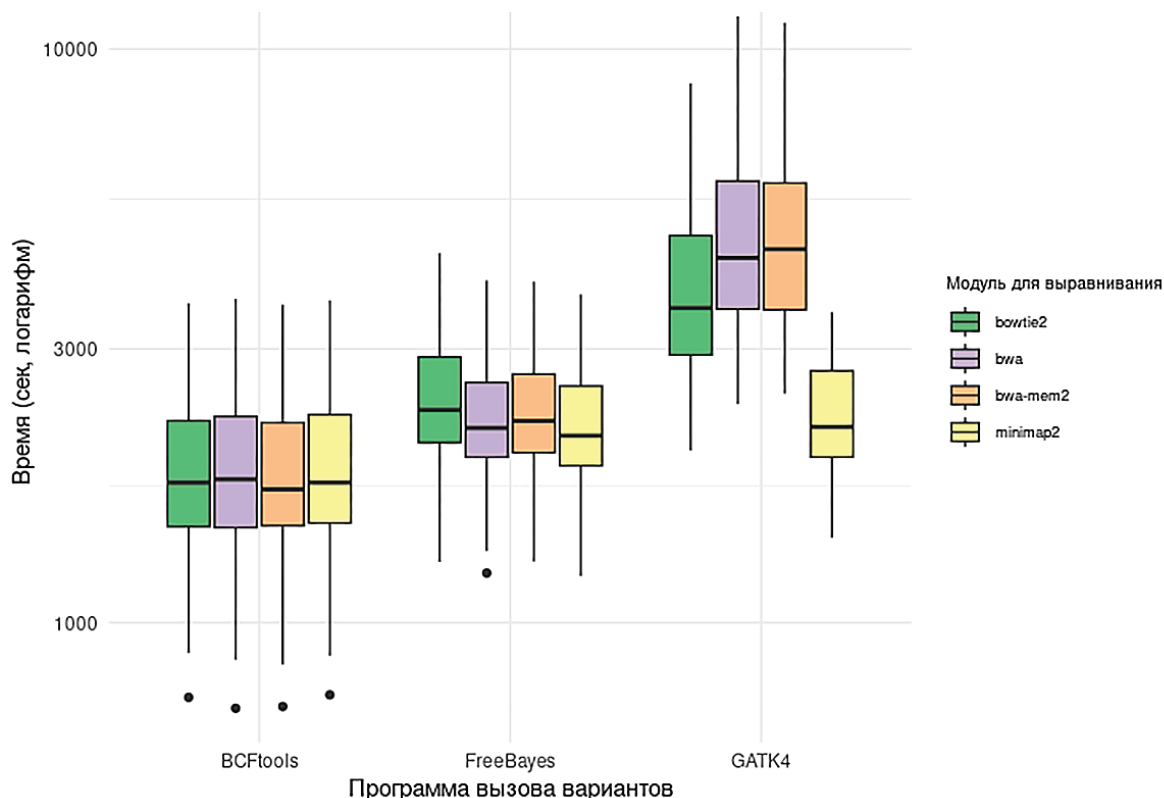


Рис. 3. Затраченное на выравнивание и вызов вариантов время

Заключение

Таким образом, в рамках данного исследования было проведено сравнение эффективности и времени выравнивания на референсную последовательность с помощью программ BWA-MEM, BWA-MEM2, Bowtie2 и Minimap2, а также вызова вариантов с использованием FreeBayes, GATK4 и Samtools + Bcftools. Наиболее высокие показатели количества и качества полученных вариантов продемонстрировало сочетание GATK4 и BWA-MEM или BWA-MEM2, однако этот вариант оказался и самым затратным по времени. Наиболее быстрой оказалась комбинация BWA-MEM2 и Samtools + Bcftools.

Коллектив авторов выражает благодарность сотрудникам лабораторий нехромосомной наследственности и экологической генетики и биотехнологии Института генетики и цитологии НАН Беларуси за предоставленные данные высокопроизводительного секвенирования.

Работа выполнена в рамках ГПНИ «Биотехнологии-2» 2021–2025 гг., подпрограмма 2 «Геномика, эпигеномика, биоинформатика».

Список использованных источников

1. Koboldt, D. C. Best practices for variant calling in clinical sequencing / D. C. Koboldt // Genome Medicine. – 2020. – Vol. 12, № 91. – P. 1–13.

2. Pereira, R. Bioinformatics and Computational Tools for Next-Generation Sequencing Analysis in Clinical Genetics / R. Pereira, J. Oliveira, M. Sousa // *Journal of Clinical Medicine*. – 2019. – Vol. 9, № 132. – P. 1–30.
3. From FastQ data to high confidence variant calls: the Genome Analysis Toolkit best practices pipeline / G. A. Van der Auwera, M. O. Carneiro, C. Hartl [et al.] // *Curr. Protoc. Bioinformatics*. – 2014. – Vol. 11, № 1110. – P. 1–43.
4. Bolger, A. M. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data / A. M. Bolger, M. Lohse, B. Usadel // *Bioinformatics*. – 2014. – Vol. 30, № 15. – P. 2114–2120.
5. Li, H. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform / H. Li, R. Durbin // *Bioinformatics*. – 2009. – Vol. 25, № 14. – P. 1754–1760.
6. Efficient Architecture-Aware Acceleration of BWA-MEM for Multicore Systems / Md. Vasimuddin, S. Misra, H. Li, S. Aluru // *IEEE Parallel and Distributed Processing Symposium (IPDPS)*. – 2019. – doi: 10.1109/IPDPS.2019.00041.
7. Langmead, B. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2 / B. Langmead, S. L. Salzberg // *Nat. Methods*. – 2012. – Vol. 9, № 4. – P. 357–359.
8. Li, H. Minimap2: pairwise alignment for nucleotide sequences / H. Li // *Bioinformatics*. – 2018. – Vol. 34, № 18. – P. 3094–3100.
9. Garrison, E. Haplotype-based variant detection from short-read sequencing / E. Garrison, G. Marth // *arXiv*. – 2012. – Vol. 1207, № 3907. – P. 1–9.
10. Van der Auwera, G. A. Genomics in the Cloud: Using Docker, GATK, and WDL in Terra / G. A. Van der Auwera, B. D. O'Connor. – 1st ed. – O'Reilly Media, 2020. – 480 p.
11. Twelve years of SAMtools and BCFtools / P. Danecek, J. K. Bonfield, J. Liddle [et al.] // *GigaScience*. – 2021. – Vol. 10, № 2. – P. 1–4.
12. Github. – URL: https://github.com/Sector-Bioinf/SNP_calling (date of access: 15.09.2025).

A. D. Liaudanski, A. M. Molchun

COMPARATIVE ANALYSIS OF ALIGNING AND VARIANT CALLING SOFTWARE

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

During the study, aligning to the reference sequence (BWA MEM, BWA MEM2, Bowtie2 and Minimap2) with subsequent variant calling (FreeBayes, GATK4, and Samtools + Bcftools) for 64 human exome NGS data samples was performed. Quality and time execution parameters for each program combination were defined. The highest quantity and quality parameters of the variants obtained were shown using GATK4 HaplotypeCaller in combination with BWA MEM and BWA MEM2. However, those combinations were the most time consuming. BWA-MEM2 with BCFtools appeared to be the fastest combination.

Keywords: high-throughput sequencing, aligning to the reference sequence, variant calling, human exome sequencing, bioinformatics.

Дата поступления в редакцию: 11 февраля 2026 г.

М. А. Чиндарева, А. И. Зинченко

СОЗДАНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО ШТАММА *BACILLUS SUBTILIS* — ПРОДУЦЕНТА КЕРАТИНАЗЫ

Государственное научное учреждение
«Институт микробиологии Национальной академии наук Беларуси»
Республика Беларусь, 220084, г. Минск, ул. Акад. Купревича, 2
e-mail: chindareva@mbio.bas-net.by

Приведены результаты исследований, посвященных созданию отечественного рекомбинантного штамма *Bacillus subtilis*, продуцирующего кератиназу — фермент, осуществляющий реакцию гидролиза водонерастворимого белка кератина до смеси растворимых пептидов и аминокислот.

В работе были использованы традиционные методы конструирования генно-инженерных бактерий, которые позволили создать штамм *B. subtilis*, характеризующийся продуцирующей способностью в отношении кератиназы *B. licheniformis*, составляющей 767 ± 47 ед/мл культуральной жидкости.

Полученные результаты могут способствовать разработке ферментативной технологии гидролиза кератинсодержащих отходов птицеперерабатывающей промышленности.

Ключевые слова: рекомбинантный штамм, плаزمид, кератиназа, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*.

Для цитирования: Чиндарева, М. А. Создание рекомбинантного штамма *Bacillus subtilis* — продуцента кератиназы / М. А. Чиндарева, 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, 2026. — Т. 40. — С. 82–90.

Введение

Кератин, представляющий собой богатый белком материал, обладает сложной физико-химической структурой. На основании вторичной структуры и аминокислотного состава полипептидов кератины разделяют на α - и β -кератины, которые преимущественно состоят из α -спиральных витков и β -складчатых листов, соответственно. Кератин также можно классифицировать как мягкий и твердый на основе количества остатков цистеина [1]. Мягкий кератин, содержащий <10% цистеина, присутствует в эпидермисе кожи, в то время как твердый кератин, содержащий около 10–14% цистеина, обнаруживается в волосах, ногтях, перьях и когтях [2].

Структурная жесткость кератина обусловлена его надмолекулярной организацией, в которой полипептидные цепи образуют структуру посредством водородных связей, гидрофобных взаимодействий и дисульфидных связей. Остатки цистеина образуют внутри- или межмолекулярные дисульфидные связи, которые способствуют уплотнению структуры

кератина и повышению ее стабильности [1, 3]. α -Кератин обычно присутствует у млекопитающих, тогда как β -кератин обнаружен в тканях птиц и рептилий [4].

Примерами α -кератина являются шерсть, волосы и рога, β -кератина — чешуя, когти, клювы и перья [5]. Кроме того, сообщается, что α -кератин более устойчив к ферментативному гидролизу по сравнению с β -кератином, потому что α -кератин имеет больше дисульфидных связей [6].

Животноводство и мясная промышленность производят огромное количество кератиновых побочных продуктов, а накопление непереработанных рогов, щетины, когтей, волос, копыт, шерсти и перьев ухудшает состояние окружающей среды [7].

В наши дни птицеводческая промышленность быстро развивается из-за высокого спроса на продукты из мяса птицы. В 2020 г. во всем мире было произведено около 100,5 млн т мяса птицы, вместе с образованием твердых отходов его производства [7]. Из них более 4,7 млн т составляют куриные перья, которые

необходимо утилизировать. Размещение отходов пера на свалках оказывает пагубное воздействие на окружающую среду и здоровье человека. Эти негативные последствия включают выщелачивание нитратов в грунтовые воды, выброс фосфора в водоемы, неприятные запахи, связанные со свалками отходов, и накопление патогенных микроорганизмов [7, 8].

Хотя сжигание перьевых отходов является решением проблемы утилизации огромного их количества, оно приводит к выбросам загрязняющих веществ в воздух и токсичных газов (аммиак, закись азота, сероводород, углекислый газ и метан), что способствует глобальному потеплению. Таким образом, необходимость очистки газообразных выбросов делает этот подход дорогостоящим [9].

В соответствии с принципами «зеленой химии», требующей поиска решений, обеспечивающих экономическое и социальное развитие стран без ущерба для окружающей среды, более экологичный подход к утилизации перьевых отходов, подчеркивающий сохранение окружающей среды, становится обязательным [10, 11].

Действительно, куриное перо содержит более 85% сырого протеина, минералов, витаминов и факторов роста, что делает его привлекательным сырьем для биотехнологического производства добавок, кормов, косметики, удобрений и иных продуктов [12].

Серьезным ограничением при использовании куриных перьев является их естественная устойчивость к деградации. Она обусловлена особенностями структуры кератина, которая образована за счет комбинации водородных связей, гидрофобных сил и, что важно, дисульфидных связей, соединяющих внутренние и межполипептидные цепи. Эта связь приводит к плотной, жесткой полимерной структуре. Такая структурная организация делает кератин в куриных перьях очень стабильным и механически прочным.

Были предприняты попытки извлечь белок из куриных перьев с помощью химических и физических методов [13]. Эти методы включают стадии щелочной экстракции, окисления, восстановления, парового взрыва, микроволнового облучения и термического гидролиза [14].

С помощью этих приемов из куриных перьев

производят перьевую муку. Перо нагревают под давлением и измельчают в порошок. Этот измельченный перьевой порошок используют в качестве кормовой добавки для жвачных животных. Однако большое количество дисульфидных связей в пере препятствует ферментативному расщеплению в желудке животных, что приводит к очень ограниченному высвобождению аминокислот и растворимого белка [7]. Кроме того, применение высокой температуры и давления приводит к расщеплению незаменимых аминокислот, таких как триптофан, метионин и лизин [15]. В результате питательная ценность конечного кормового продукта заметно снижается [16].

Другим распространенным методом обработки куриных перьев является щелочной гидролиз. Хотя он эффективен для повышения усвояемости кератина, этот процесс может привести к модификации или расщеплению аминокислот.

Таким образом, рациональное обращение с перьевыми отходами нуждается в технологиях, направленных на повышение питательной ценности перерабатываемого продукта и минимизацию воздействия на окружающую среду.

В последние годы наблюдается значительный интерес к биологическим процессам, использующим ферменты и микроорганизмы для разложения куриных перьев. Это объясняется тем, что ферментативные и микробиологические процедуры можно проводить в щадящих условиях с образованием менее токсичных отходов [12, 17].

Кератиназы (ЕС 3.4.21/24/99.11) представляют собой класс протеолитических ферментов, способных расщеплять кератиновую биомассу, в результате чего образуются гидролизаты белка с высоким содержанием питательных веществ [17]. Эти ферменты обнаружены у грибов и бактерий, представляющих роды *Candida*, *Aspergillus*, *Streptomyces* и *Bacillus* [18, 19].

Род *Bacillus* является наиболее изученным родом бактерий, продуцирующих кератиназу, которые могут расщеплять кератин куриных перьев. При этом несколько штаммов, относящихся к видам *Bacillus*, продемонстрировали потенциал для производства кератиназы в коммерческих масштабах [15, 20].

Следует особо подчеркнуть, что бактерия *B. subtilis* была официально подтверждена как безопасная бактерия-хозяин для синтеза промышленных ферментов, вакцинных антигенов и лекарственных средств [18]. Известно также, что определенные штаммы *B. pumilus* демонстрируют хорошую способность расщеплять как α -, так и β -кератины, что показывает потенциал ферментативной переработки шерсти и пера в полезные продукты [21].

Нами ранее создан рекомбинантный штамм *Escherichia coli* [22], продуцирующий кератиназу *Bacillus licheniformis*.

Следует отметить, что практическое использование штамма *E. coli*, образующего внутриклеточную кератиназу, предполагает этап разрушения клеток, что экономически нецелесообразно при масштабировании производства данного фермента. Кроме того, этот штамм-продуцент требует для наработки целевого продукта использования дорогостоящего индуктора экспрессии клонированного гена.

Принимая во внимание эти обстоятельства, в настоящем исследовании изучена возможность создания штамма-продуцента кератиназы, используя бациллярную безиндукторную систему экспрессии, приводящую к получению внеклеточного фермента.

Материалы и методы

Источником гена, кодирующего кератиназу без сигнального пептида, являлась сконструированная ранее плазида pET42-mutkerA [23]. В качестве источника нуклеотидных последовательностей сигнального пептида липазы (SP_{LipA}) и промотора P43 использовали тотальную ДНК *B. subtilis* 168, полученную фенол-хлороформным методом. Генетическую конструкцию для экспрессии целевого белка создавали на основе плазмиды pDG148-Stu [24]. Для амплификации генов и линейаризации экспрессионного вектора использовали полимеразную цепную реакцию (ПЦР) со специально подобранными праймерами (табл. 1).

Таблица 1

Последовательности олигонуклеотидных праймеров

Праймер	Назначение
pDG_SP-F (5'-GGAGGAAGCAGGATGAAATTTGTA AAAAGAAGGATCATTG-3')	Амплификация сигнального пептида SP_{LipA}
SPlip-R (5'-TTAATGATGATGATGATGATGTTGAGCGGCAGCTTCG-3')	
SPkerA-F (5'-AATGTTGAAAAGGATTATATTGTCGG-3')	Амплификация гена <i>kerA</i>
pDG_kerA-R (5'-TTAATGATGATGATGATGATGTTGAGCGGCAGCTTCG-3')	
P43-up (5'-GAACAACCTCTGCGCCAAAGCTGTAATGGC-3')	Амплификация промотора P43
P43-down (5'-CTTTTACAAATTCATGTGTACATTCCTCTCTTACCTATAA-3')	
pDGdel-F (5'-CAATTAAGCTCTAAGGAGGAAGCAGG-3')	Линейаризация вектора pDG148-Stu
pDGdel-R (5'-GCAGAGGTTGTTCTGGATGTAGAAC-3')	

Объединение нуклеотидных последовательностей осуществляли методом продолжительной перекрывающейся ПЦР (ПП-ПЦР) [25]. Накопление целевой плазмиды проводили в штамме *E. coli* XL-1 Blue (Agilent, США). Для выделения плазмидной ДНК из клеток *E. coli* XL-1 Blue использовали коммерческий набор «Monarch Plasmid Miniprep» (NEB, США).

Трансформацию реципиентных клеток *B. subtilis* RIK1285 (*trpC2*, *ys1*, *aprEdelta3*, *nprR2*, *nprE18*) полученной генетической конструкцией осуществляли согласно методике [26]. Отбор клонов, содержащих целевую плазмиду, осуществляли методом пересева выросших колоний на агаризованную среду LB с 1% обезжиренным молоком. Стабильность наследования генетической конструкции трансформированными клетками определяли согласно методике [27]. Кератинолитическую активность рекомбинантной кератиназы определяли с использованием субстратов кератин-азура [28] и перьевой муки [29]. За единицу ферментативной активности принимали количество фермента, необходимого для увеличения оптической плотности ($\lambda = 595$ нм — для кератин-азура; $\lambda = 280$ нм — для перьевой муки) реакционной смеси на 0,01 ед. за 1 ч. Кроме того, степень гидролиза (%) перьевой муки оценивали по убыли массы нерастворенного субстрата. Перьевую муку массой $25 \pm 0,5$ мг инкубировали при температуре 60 °С в течение 1–4 ч при перемешивании 900 об/мин с 1 мл бесклеточной культуральной жидкости. Жидкость удаляли, осадок высушивали при 80 °С в течение 24 ч. Степень гидролиза (%) рассчитывали по формуле:

$$\text{Степень гидролиза} = \frac{(m_{\text{нач}} - m_{\text{кон}})}{m_{\text{нач}}} \times 100\%,$$

где $m_{\text{нач}}$ — масса перьевой муки начальная;
 $m_{\text{кон}}$ — масса перьевой муки конечная.

Для статистической обработки данных использовали методы, принятые в биологии [30]. Приведенные в работе экспериментальные данные представляют собой усредненные величины 3–5 опытов. Среднее значение

и 95%-й доверительный интервал (\pm) рассчитывали с помощью программы Microsoft Excel.

Глубинное культивирование *B. subtilis* осуществляли в жидкой среде следующего состава (%): дрожжевой экстракт — 1,0; пептон — 2,0; глюкоза — 1; NaCl — 0,5; канамицин — 0,002 при следующих параметрах: температура — 37 °С, частота вращения шейкера-инкубатора — 200 об/мин, время культивирования — 24 ч.

По окончании культивирования клетки осаждали центрифугированием при 7000 g в течение 5 мин. Надосадочную жидкость использовали для определения ферментативной активности целевого продукта, а также для его визуализации при помощи денатурирующего полиакриламидного гель-электрофореза. Для определения молекулярных масс белков использовали стандарт BLUeye Prestained Protein Ladder (Merck, Германия).

Результаты и обсуждение

Сборка генетической конструкции осуществлялась в несколько этапов:

- 1) амплификация экспрессионного вектора pDG148-Stu, не содержащего промоторной области;
- 2) амплификация промотора P43;
- 3) амплификация нуклеотидных последовательностей сигнального пептида и гена *kerA* и их объединение (рис. 1).

Объединение полученных нуклеотидных последовательностей проводили методом ПП-ПЦР, в результате чего была получена плазмиды, обозначенная как pDG-P43kerA (рис. 2).

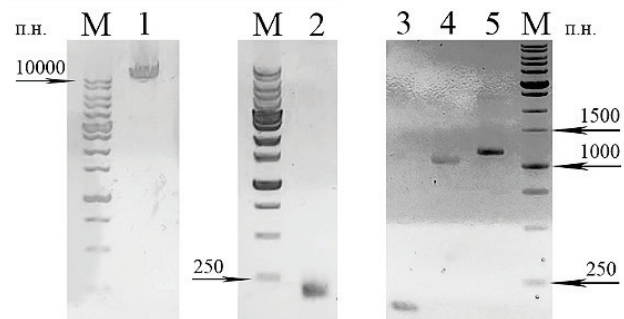


Рис. 1. Электрофореграмма линейаризованного вектора pDG148-Stu (1), промотора P43 (2), сигнального пептида (3), гена *kerA* (4) и объединенных нуклеотидных последовательностей сигнального пептида и гена (5).

M — маркер молекулярной массы

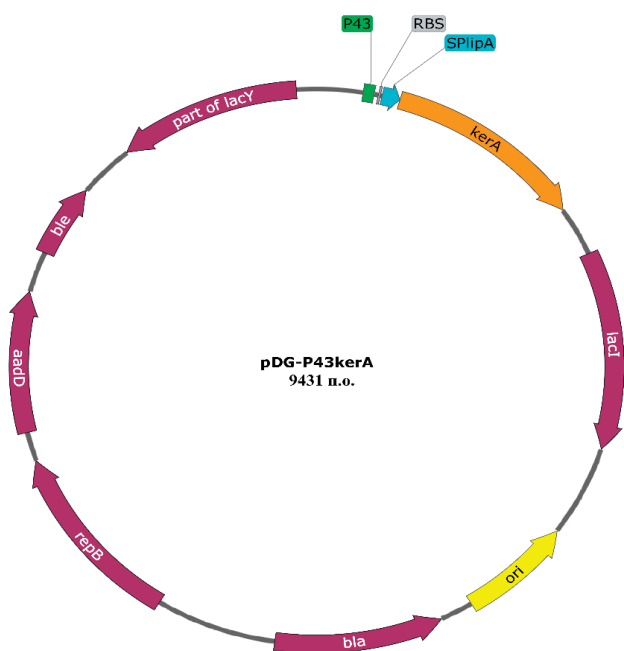


Рис. 2. Генетическая карта конструкции, несущей ген *kerA*

Полученной генетической конструкцией трансформировали компетентные клетки *B. subtilis* RIK1285, клоны, образующие зоны лизиса на агаризованной среде LB с 1% обезжиренным молоком, использовали далее в работе. Стабильность наследования плазмиды pDG-P43kerA составила 94% в течение 20–22 генераций (рис. 3).

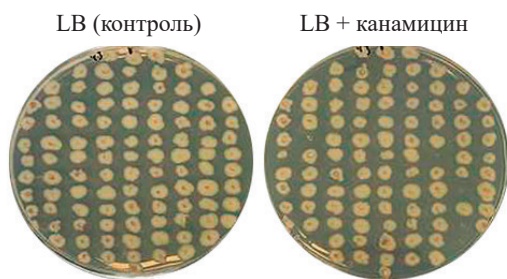


Рис. 3. Результаты оценки стабильности наследования плазмиды pDG-P43kerA на агаризованной среде LB без антибиотика (слева) и с антибиотиком (справа)

Полученный рекомбинантный штамм обозначили как *B. subtilis* P43kerA. Культивирование *B. subtilis* P43kerA проводили в течение 24 ч при 37 °С, синтез целевого продукта оценивали методом электрофореза в полиакриламидном геле. Исходя из результатов, представленных на рисунке 4, штамм *B. subtilis* P43kerA

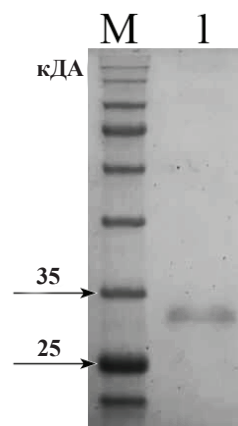


Рис. 4. Электрофореграмма в полиакриламидном геле рекомбинантной кератиназы. 1 — бесклеточная культуральная жидкость после культивирования *B. subtilis* P43kerA; М — стандарты белков с известной молекулярной массой

продуцирует белок, соответствующий теоретически рассчитанной массе активной формы кератиназы (~30 кДа).

Ферментативную активность штамма определяли с использованием субстратов кератин-азура и перьевой муки (рис. 5). По сравнению с исходным штаммом-донором *B. licheniformis* БИМ В-400, активность штамма *B. subtilis* P43kerA выше в 8,5 раза (субстрат: кератин-азур) и 6,6 раза (субстрат: перьевая мука).

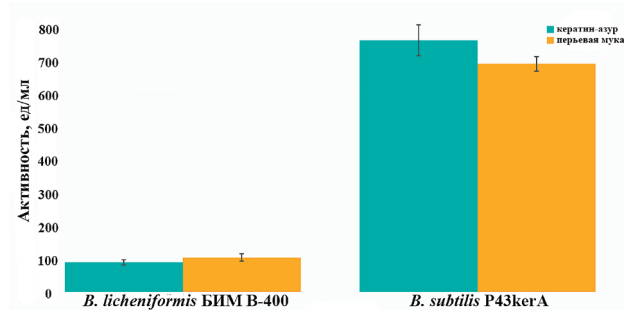


Рис. 5. График ферментативной активности штамма *B. subtilis* P43kerA и штамма-донора *B. licheniformis* БИМ В-400

Также оценивали степень гидролиза перьевой муки бесклеточной культуральной жидкостью рекомбинантного штамма, содержащей кератиназу. Установлено, что инкубация в течение 3 ч приводит к солубилизации нерастворимого кератинсодержащего субстрата на >90% (рис. 6).

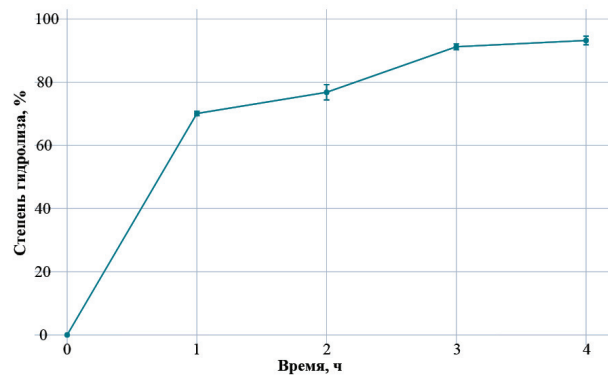


Рис. 6. График зависимости степени гидролиза перьевой муки бесклеточной культуральной жидкостью штамма *B. subtilis* P43kerA от времени инкубации

Необходимо отметить, что ферментативная активность, измеренная на разных кератин-содержащих субстратах, отличается, что затрудняет сравнительный анализ с описанными в научной литературе штаммами-продуцентами кератиназы.

Однако, по сравнению с аналогичными штаммами-продуцентами, активность которых измерена на кератин-азуре или перьевой муке, продуцирующая способность штамма *B. subtilis* P43kerA соответствует уровню, описанному в литературе (табл. 2).

Таблица 2

Рекомбинантные штаммы-продуценты кератиназы

Штамм-донор	Штамм-реципиент	Субстрат	Активность	Ссылка
<i>B. licheniformis</i> БИМ В-400	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	Кератин-азур	709 ± 29 ед/мл	[23]
<i>B. licheniformis</i> ER-15	<i>E. coli</i>	Кератин-азур	11,25 ед/мл	[31]
<i>B. altitudinis</i> RBDV1	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	Кератин-азур	169 ед/мл	[32]
<i>B. licheniformis</i> S90	<i>Pichia pastoris</i> X-33	Кератин-азур	324 ед/мл	[33]
<i>B. licheniformis</i> MKU3	<i>P. pastoris</i> X-33	Кератин-азур	135 ед/мл	[34]
<i>B. licheniformis</i> MKU3	<i>B. megaterium</i> ATCC14945	Кератин-азур	95 ± 2,4 ед/мл	[35]
<i>B. polyfermenticus</i> В4	<i>B. subtilis</i> PT5	Перьевая мука	473 ± 20 ед/мл	[29]
<i>B. subtilis</i>	<i>B. subtilis</i> DB428	Перьевая мука	501 ± 34 ед/мл	[36]
<i>B. licheniformis</i> БИМ В-400	<i>B. subtilis</i> RIK1285	Кератин-азур	767 ± 47 ед/мл	Данная работа

Заключение

Впервые на основе вектора pDG148-Stu была создана генетическая конструкция для экспрессии кератиназы под контролем сильного конститутивного промотора P43. Продуцирующая способность полученного рекомбинантного штамма *B. subtilis* P43kerA, определенная

с использованием кератин-азура, составила 767 ± 47 ед/мл КЖ, с использованием перьевой муки — 695 ± 22 ед/мл КЖ, что соответствует продуцирующей способности аналогичных штаммов-продуцентов, описанных в известной нам научной литературе.

Список используемых источников

1. Li, Q. Structure, application, and biochemistry of microbial keratinases / Q. Li // *Frontiers in Microbiology*. – 2021. – Vol. 12. – Art. 674345. – doi: 10.3389/fmicb.2021.674345.
2. Development of a keratinase activity assay using recombinant chicken feather keratin substrates / H. S. Jin, S. Y. Park, K. Kim [et al.] // *PLoS One*. – 2017. – Vol. 12, № 2. – Art. e0172712. – doi: 10.1371/journal.pone.0172712.
3. The structure, functions, and mechanical properties of keratin / J. McKittrick, P. Y. Chen, S. G. Bodde [et al.] // *JOM*. – 2012. – Vol. 64, № 4. – P. 449–468. – DOI: 10.1007/s11837-012-0302-8.
4. Engineering with keratin: a functional material and a source of bioinspiration / B. S. Lazarus, C. Chadha, A. Velasco-Hogan [et al.] // *iScience*. – 2021. – Vol. 24, № 8. – Art. 102798. – doi: 10.1016/j.isci.2021.102798.
5. Evaluation of biological degraded keratin for biogas production using dry anaerobic digestion system / S. Setyaningrum, R. J. Patinvoh, R. Purwadi, M. Taherzadeh // *International Journal Applied Technology Research*. – 2021. – Vol. 2, № 2. – P. 81–89. – doi: 10.35313/ijat.v2i2.49.
6. Gupta, R. Revisiting microbial keratinases: next generation proteases for sustainable biotechnology / R. Gupta, R. Sharma, Q. K. Beg // *Critical Reviews in Biotechnology*. – 2013. – Vol. 33, № 2. – P. 216–228. – doi: 10.3109/07388551.2012.685051.
7. Bhari, R. Chicken feather waste hydrolysate as a superior biofertilizer in agroindustry / R. Bhari, M. Kaur, R. Sarup Singh // *Current Microbiology*. – 2021. – Vol. 78, № 6. – P. 2212–2230. – doi: 10.1007/s00284-021-02491-z.
8. Degradation by keratinolytic bacteria and biofertilizing potential for sustainable agricultural production / K. Tamreihao, S. Mukherjee, R. Khunjamayum [et al.] // *Journal of Basic Microbiology*. – 2019. – Vol. 59, № 1. – P. 4–13. – doi: 10.1002/jobm.201800434.
9. Callegaro, K. Beyond plucking: feathers bioprocessing into valuable protein hydrolysates / K. Callegaro, A. Brandelli, D. J. Daroit // *Waste Management*. – 2019. – Vol. 95. – P. 399–415. – doi: 10.1016/j.wasman.2019.06.040.
10. Akinsemolu, A. A. The role of microorganisms in achieving the sustainable development goals / A. A. Akinsemolu // *Journal of Cleaner Production*. – 2018. – Vol. 182. – P. 139–155. – doi: 10.1016/j.jclepro.2018.02.081.
11. Reins, L. The “Safe and Sustainable by Design” concept — A regulatory approach for a more sustainable circular economy in the European Union? / L. Reins, J. Wijns // *European Journal of Risk Regulation*. – 2025. – Vol. 16, № 1. – P. 96–113.
12. Keratin waste recycling based on microbial degradation: mechanisms and prospects / Z. Peng, J. Zhang, G. Du, J. Chen // *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*. – 2019. – Vol. 7, № 11. – P. 9727–9736. – doi: 10.1021/acssuschemeng.9b01527.
13. Molecular strategies to increase keratinase production in heterologous expression systems for industrial applications / R. S. R. Yahaya, Y. M. Normi, L. Y. Phang [et al.] // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2021. – Vol. 105, № 10. – P. 3955–3969. – doi: 10.1007/s00253-021-11321-y.
14. Valorisation of keratin waste: controlled pretreatment enhances enzymatic production of antioxidant peptides / G. Cai, K. Moffitt, L. Navone [et al.] // *Journal of Environmental Management*. – 2022. – Vol. 301. – Art. 113945. – doi: 10.1016/j.jenvman.2021.113945.
15. Current understanding of feather keratin and keratinase and their applications in biotechnology / T. Moktip, L. Salaipeh, A. E. Cope [et al.] // *Biochemistry Research International*. – 2025. – Vol. 2025, № 1. – Art. 6619273. – doi: 10.1155/bri/6619273.
16. Microbial keratinases: an overview of biochemical characterization and its eco-friendly approach for industrial applications / B. Srivastava, M. Khatri, G. Singh, S. K. Arya // *Journal of Cleaner Production*. – 2020. – Vol. 252. – Art. 119847. – doi: 10.1016/j.jclepro.2019.119847.
17. Nnolim, N. E. Microbial keratinase and the bio-economy: a three-decade meta-analysis of research exploit / N. E. Nnolim, U. U. Nwodo // *AMB Express*. – 2021. – Vol. 11, № 1. – Art. 12. – doi: 10.1186/s13568-020-01155-8.
18. Recombinant expression and biochemical characterization of a novel keratinase BsKER71 from feather degrading bacterium *Bacillus subtilis* S1-4 / B. Yong, X. Fei, H. Shao [et al.] // *AMB Express*. – 2020. – Vol. 10, № 1. – Art. 9. – doi: 10.1186/s13568-019-0939-6.
19. Sharma, I. Production and characterization of keratinase by *Ochrobactrum intermedium* for feather keratin utilization / I. Sharma, N. Kango // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2021. – Vol. 166. – P. 1046–1056. – doi:

10.1016/j.ijbiomac.2020.10.260.

20. Biochemical characterization of an alkaline surfactant-stable keratinase from a new keratinase producer, *Bacillus Zhangzhouensis* / R. Moridshahi, M. Bahreini, M. Sharifmoghaddam, A. Asoodeh // *Extremophiles*. – 2020. – Vol. 24, № 5. – P. 693–704. – doi: 10.1007/s00792-020-01187-9.

21. Identification of two new keratinolytic proteases from a *Bacillus pumilus* strain using protein analysis and gene sequencing / S. Fellahi, A. Chibani, E. Feuk-Lagerstedt, M. J. Taherzadeh // *AMB Express*. – 2016. – Vol. 6, № 1. – Art. 42. – doi: 10.1186/s13568-016-0213-0.

22. Чиндарева, М. А. Получение штамма *Escherichia coli* – продуцента кератиназы *Bacillus licheniformis* / М. А. Чиндарева, И. С. Казловский, А. И. Зинченко // Сб. науч. трудов Института микробиологии НАН Беларуси «Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты». – Т. 13. – Минск, «Беларуская навука», 2021. – С. 143–152.

23. Чиндарева, М. А. Повышение каталитической активности кератиназы *Bacillus licheniformis* БИМ В-400 методом сайт-специфического мутагенеза / М. А. Чиндарева, А. И. Зинченко // Сб. науч. трудов Института микробиологии НАН Беларуси «Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты». – Т. 16. – Минск, «Беларуская навука», 2024. – С. 135–144.

24. Rapid orientated cloning in a shuttle vector allowing modulated gene expression in *Bacillus subtilis* / P. Joseph, J. R. Fantino, M. L. Herbaud, F. Denizot // *FEMS Microbiology Letters*. – 2001. – Vol. 205, № 1. – P. 91–97.

25. Quan, J. Circular polymerase extension cloning of complex gene libraries and pathways / J. Quan, J. Tian // *PLoS ONE*. – 2009. – Vol. 4, № 7. – P. 6441–6442.

26. Transformation of heterolous DNA in *Bacillus subtilis* / K. B. Falkenberg, C. H. Rollan, M. Rennig [et al.] // *Protocols.io*. – 2020. – doi: 10.17504/protocols.io.bdmti46n.

27. Василенко, С. Л. Особенности наследо-

вания плазмид биодegradации в клетках го-мо- и гетерологичных хозяев / С. Л. Василенко, М. А. Титок // *Микробиология*. – 2008. – Т. 77, № 1–3. – С. 21–28.

28. Purification and characterization of a keratinolytic serine proteinase from *Streptomyces albidoflavus* / P. Bressollier, F. Letourneau, M. Urdaci, B. Verneuil // *Applied and Environmental Microbiology*. – 1999. – Vol. 65, № 6. – P. 2570–2576.

29. Dong, Y. Z. Characterization and overexpression of a novel keratinase from *Bacillus polyfermenticus* B4 in recombinant *Bacillus subtilis* / Y. Z. Dong, W. S. Chang, P. T. Chen // *Bioresources and Bioprocessing*. – 2017. – Vol. 4, № 1. – Art. 47.

30. Рокицкий, П. Ф. Биологическая статистика / П. Ф. Рокицкий. – Минск: Высш. шк., 1973. – 320 с.

31. Tiwary, E. Extracellular Expression of Keratinase from *Bacillus licheniformis* ER-15 in *Escherichia coli* / E. Tiwary, R. Gupta // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2010. – Art. 14.

32. Molecular and biochemical characterization of a thermostable keratinase from *Bacillus altitudinis* RBDV1 / V. A. Pawar, A. S. Prajapati, R. C. Akhni [et al.] // *3 Biotech*. – 2018. – Art. 107.

33. Codon Optimization Significantly Improves the Expression Level of a Keratinase Gene in *Pichia pastoris* / H. Hu, J. Gao, J. He [et al.] // *PLoS ONE*. – 2013. – Vol. 8, № 3. – P. e58393.

34. Radha, S. Purification and characterization of keratinase from recombinant *Pichia* and *Bacillus strains* / S. Radha, P. Gunasekaran // *Protein Expression and Purification*. – 2009. – Art. 64.

35. Radha, S. Cloning and expression of keratinase gene in *Bacillus megaterium* and optimization of fermentation conditions for the production of keratinase by recombinant strain / S. Radha, P. Gunasekaran // *Journal of Applied Microbiology*. – 2007. – Vol. 103, № 4. – P. 1301–1310.

36. Development of *Bacillus subtilis* self-inducible expression system for keratinase production using piggery wastewater / M.-Z. Cai, P. E. Kee, H. S. Ng, P.-T. Chen // *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*. – 2022. – Art. 104218.

M. A. Chindareva, A. I. Zinchenko

ENGINEERING A RECOMBINANT *BACILLUS SUBTILIS* STRAIN PRODUCING KERATINASE

State Scientific Institution

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

2 Kuprevich St., Minsk 220084, Republic of Belarus

e-mail: chindareva@mbio.bas-net.by

In the present study, research results on the creation of a domestic recombinant *Bacillus subtilis* strain producing keratinase, an enzyme that hydrolyzes the water-insoluble protein keratin into a mixture of soluble peptides and amino acids, are demonstrated.

Traditional techniques for constructing genetically engineered bacteria, which enabled the creation of the *B. subtilis* strain characterized by its ability to produce keratinase derived from *B. licheniformis*, with the activity of 767 ± 47 U/ml of the culture fluid, were used.

The results obtained may contribute to the development of an enzymatic technology for the hydrolysis of keratin-containing waste from the poultry processing industry.

Keywords: recombinant strain, plasmid, keratinase, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*.

Дата поступления статьи: 23 января 2026 г.

М. А. Винтер, А. И. Зинченко

ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНОЙ ХИТИНАЗЫ *BACILLUS LICHENIFORMIS* В КЛЕТКАХ *ESCHERICHIA COLI*

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

Создан рекомбинантный штамм *Escherichia coli*, образующий хитиназу. Данный штамм характеризуется продуцирующей способностью в отношении хитиназы, составляющей 382 ед/л культуральной жидкости. Синтезирован меченный красителем Кумасси R-250 конъюгат коллоидного хитина, позволяющий измерять активность хитиназы спектрофотометрически. Изучено влияние pH буфера на активность фермента, конечную степень гидролиза хитина и получаемый продукт. Полученные результаты могут быть использованы для разработки технологии биодеградации хитина.

Ключевые слова: рекомбинантная бактерия, хитин, хитиназа, *Escherichia coli*, *Bacillus licheniformis*.

Для цитирования: Винтер, М. А. Получение рекомбинантной хитиназы *Bacillus licheniformis* в клетках *Escherichia coli* / 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, 2026. – Т. 40. – С. 91–99.

Введение

Хитин представляет собой полимер, состоящий из N-ацетилглюкозаминных звеньев, и является вторым по распространенности в природе полисахаридом после целлюлозы [1, 2]. Он широко представлен в клеточных стенках ракообразных, экзоскелетах насекомых, моллюсках и грибах [3]. Хитин является основным отходом культивирования ракообразных, составляющим более 100 000 т в год в Европе, поэтому остро стоит вопрос его утилизации. Природный хитин обладает плотной кристаллической структурой и нерастворим в обыч-

ных растворителях, что серьезно ограничивает его практическое применение [4, 5].

Хитиназы (КФ 3.2.1.14) — ферменты, катализирующие гидролиз O-гликозидных связей хитина до олигомеров (рис. 1). Продуктами хитиназ являются бактерии, грибы, насекомые, ракообразные и семенные растения [6, 7]. Бактерии вовлечены в деградацию хитина в естественной среде, внося значительный вклад в круговорот углерода и азота [8, 9]. Продукция хитиназ является фактором вирулентности у энтомопатогенных бактерий [10], которые используют хитин в качестве источни-

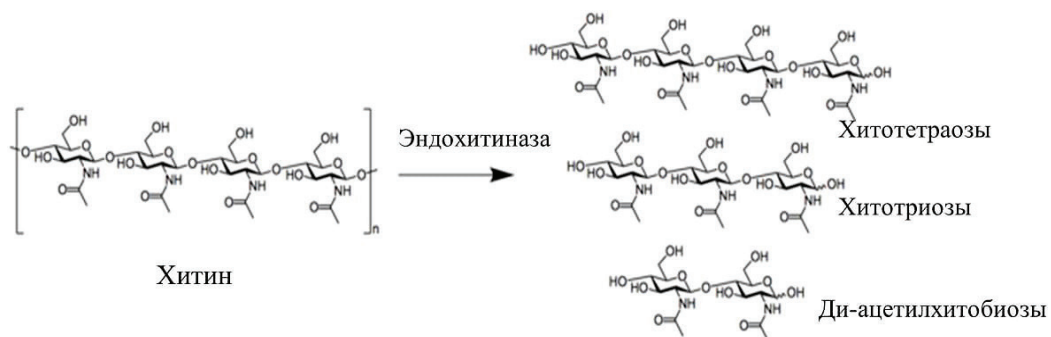


Рис. 1. Схема реакции разложения хитина хитиназой

элонгация (1 мин 10 с при 72 °С).

Продукты амплификации анализировали электрофоретически в 1%-ном агарозном геле. Отбирали бактерии, клетки которых содержали плазмиду рЕТ24а(+) со вставкой гена *chiB* в правильной ориентации.

Глубинное культивирование *E. coli* осуществляли в жидкой среде следующего состава (%): дрожжевой экстракт — 0,5; пептон — 1; глюкоза — 1; MgSO₄ — 0,02; Na₂HPO₄ — 0,36; KH₂PO₄ — 0,34; NH₄Cl — 29,6; Na₂SO₄ — 0,07, канамицин — 0,01. Бактерии выращивали на термостатируемой качалке при температуре 37 °С до достижения оптической плотности культуральной жидкости (КЖ) 1,0 ($\lambda = 600$ нм), затем вносили индуктор — изо-пропил- β -D-1-тиогалактопиранозид (ИПТГ) (Carl Roth, Германия) до конечной концентрации 0,5 мМ и продолжали культивирование в течение 4 ч при температуре 30 °С. Затем клетки осаждали центрифугированием при 10 000 г в течение 5 мин. Супернатант удаляли, клетки ресуспендировали в лизирующем буфере (300 мМ NaCl; 10 мМ имидазол; 50 мМ NaH₂PO₄; pH 8,0) и разрушали ультразвуком, используя прибор Sonifier-450 (Branson, США), при следующих режимах: мощность — 0,05 кВт; температура — 4 °С; продолжительность — 600 импульсов по 0,5 с.

Клеточные лизаты осветляли центрифугированием при 60 000 г в течение 30 мин. Надосадочную жидкость наносили на хроматографическую колонку со смолой Ni²⁺-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 NaH₂PO₄; 0,5% 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 NaH₂PO₄, 500 мМ имидазол (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 Брэдфорда.

Коллоидный хитин готовили следующим образом: к 1 г хитина добавляли 16 мл соляной кислоты и инкубировали при комнатной температуре с перемешиванием в течение часа. Далее к хитину добавляли дистиллированную воду до конечного объема 50 мл и продолжали перемешивание в течение суток. Полученный коллоидный раствор хитина фильтровали и полученный осадок промывали дистиллированной водой до достижения нейтрального значения pH и растворяли в объеме дистиллированной воды до конечной концентрации коллоидного хитина 1%.

Синтез конъюгата коллоидного хитина с красителем Кумасси R-250 осуществляли следующим образом: 50 мг Кумасси R-250 добавляли к 10 мл 1%-го раствора коллоидного хитина при постоянном перемешивании и температуре 50 °С, после чего по каплям вносили 7 мл 1 М раствора Na₂SO₄. Далее в реакционную смесь добавляли 5 мл 0,5 М раствора Na₃PO₄ × 12 H₂O и продолжали инкубировать при 50 °С в течение часа. Для полученного раствора конъюгата коллоидного хитина с Кумасси R-250, с целью отделения от примесей солей и несвязавшегося красителя, проводили диализ в дистиллированной воде в течение суток [21].

Ферментативный гидролиз хитина проводили в 1 мл реакционной смеси в следующих условиях: конъюгат коллоидного хитина — 0,1%, натрий-ацетатный буфер (pH 5,5) — 10 мкмоль, хитиназа. Реакцию вели при температуре 37 °С. Ход процесса контролировали при помощи ТСХ на пластинах Silica gel 60 F254 (Merck, Германия) в системе растворителей бутанол–метанол–аммиак–вода (5:4:2:1 по объему), а также спектрофотометрически при длине волны $\lambda = 595$ нм в супернатанте.

Изучение влияния pH на активность хитиназы проводили в следующих условиях: конъюгат коллоидного хитина — 0,1%, натрий-ацетатный буфер (pH 5,5)/Трис-HCl-буфер (pH 7,0–9,0) — 10 мМ, хитиназа.

Активность хитиназы измеряли с помощью коллоидного хитина, конъюгированном с Кумасси R-250. За единицу активности фермента принимали такое его количество, которое обеспечивало образование олигомера конъюгата N-ацетилглюкозамин-Кумасси R-250 в количестве 1 мкмоль за 1 ч протекания реакции.

Результаты и обсуждение

Нами был выделен образец хромосомальной ДНК штамма *Bacillus licheniformis* БИМ В-1872 методом фенольной экстракции. Амплификацию гена проводили, как описано в разделе «Материалы и методы».

Амплифицированный ген был встроен в предварительно линейаризованный вектор pET42a(+) с помощью ПП-ПЦР, в результате чего была получена генетическая конструкция, обозначенная как pET42-ChiB-*B. licheniformis* (рис. 2).

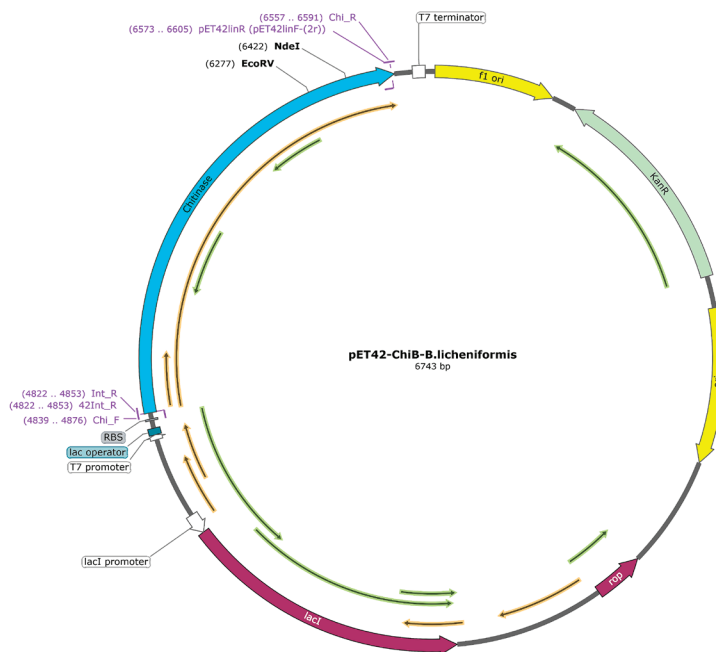


Рис. 2. Генетическая карта конструкции, несущей ген *chiB* *B. licheniformis*

Полученными плазмидами трансформировали реципиентный штамм *E. coli* BL21 (DE3) и отбирали трансформанты, содержащие плазмиду с геном *chiB*, встроенным в правильной ориентации. Скрининг вырос-

ших трансформантов осуществляли с помощью ПЦР (рис. 3).

Индукция синтеза хитиназы и последующая очистка фермента выявили синтез трансформантами целевого белка (рис. 4 и 5).

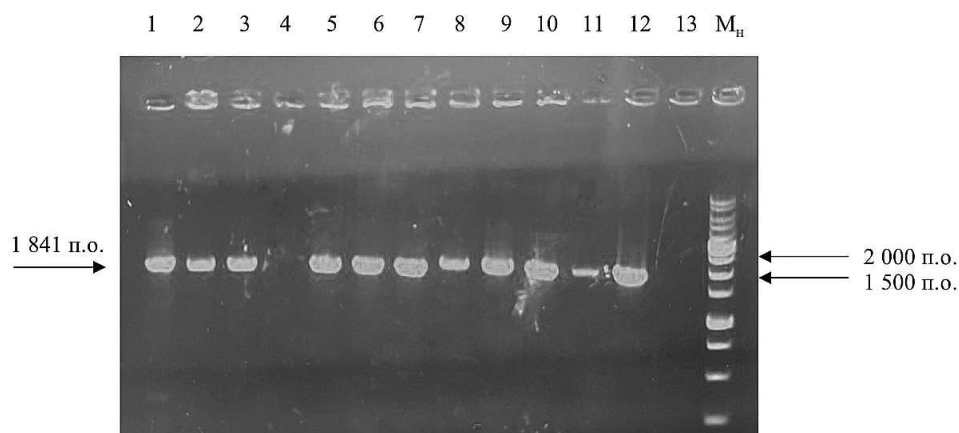


Рис. 3. Электрофореграмма продуктов ПЦР-скрининга на наличие гена хитиназы *B. licheniformis*: 1–10 — ампликоны из соответствующих клонов-трансформантов; M_{II} — маркер молекулярных масс фрагментов ДНК

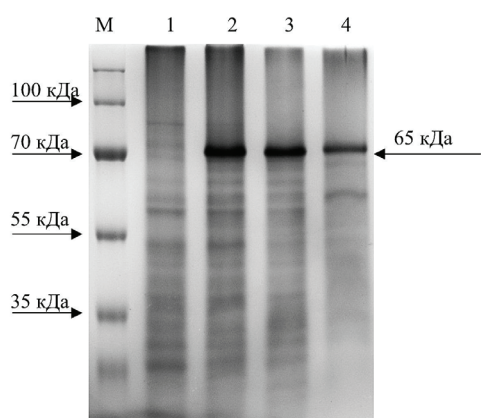


Рис. 4. Электрофореграмма белкового состава клеток *E. coli* BL, несущих плазмиду с геном *chiB*: 1 — клеточный лизат до индукции; 2 — клеточный лизат после индукции; 3 — супернатант клеточного лизата; 4 — тела включения; М — (здесь и далее) маркер молекулярной массы белка

Как видно из рисунка 4, образуемый фермент накапливается как в растворимой фракции клеточного лизата, так и формирует тельца включения.

Продуктивность штамма в расчете на синтезируемый белок составляет 49 мг/л КЖ. Молекулярная масса выделенного белка равна 65 кДа, что соответствует целевому ферменту.

Аналитическую реакцию гидролиза конъюгата коллоидного хитина проводили, как описано в разделе «Материалы и методы». В процессе реакции высвобождается олигомер хитина, конъюгированный с Кумасси R-250 и растворимый в водно-буферной среде, что позволяет спектрофотометрически отслежи-

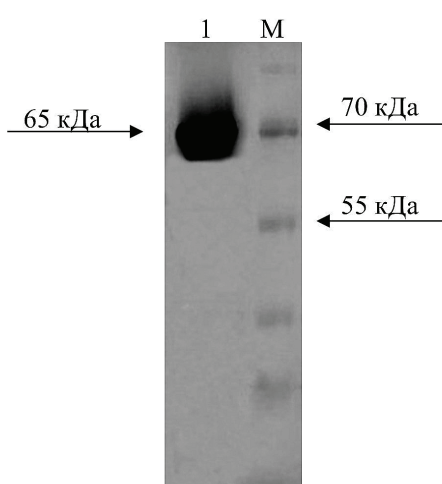


Рис. 5. Электрофореграмма хитиназы после металл-аффинной хроматографии

вать ход реакции (рис. 6).

Изучение влияния рН на активность хитиназы (рис. 7) показало, что наибольшую активность (7,8 ед/мг белка) фермент проявляет в Трис-НСl-буфере при рН 9,0. В то же время наибольшая степень гидролиза хитина до олигомеров хитиназой (95%) достигается в натрий-ацетатном буфере при рН 5,5, тогда как в Трис-НСl-буфере (рН 9,0) степень гидролиза достигала 65% к 4 ч и в течение следующих 24 ч не увеличивалась. Тем не менее при рН 9,0 было показано изменение паттерна гидролиза коллоидного хитина с образованием хитотриозы и диацетилхитобиозы (рис. 8). Данное явление может быть объяснено влиянием на ионизацию аминокислотных остатков в активном центре фермента и требует даль-

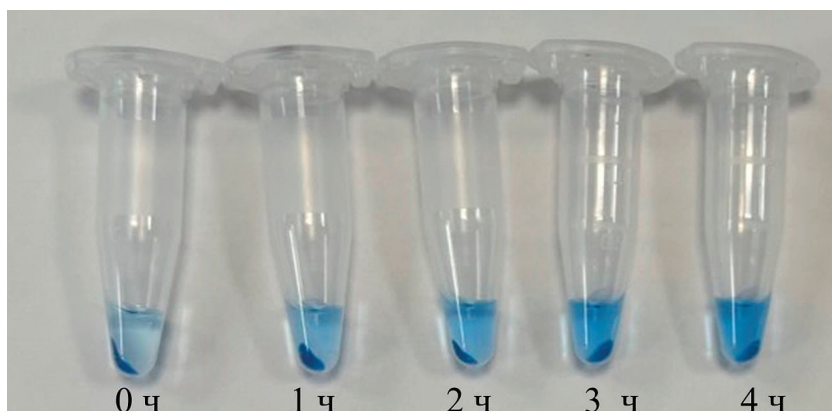


Рис. 6. Высвобождение олигомеров N-ацетилглюкозамин-Кумасси R-250 в ходе реакции гидролиза, катализируемой рекомбинантной хитиназой

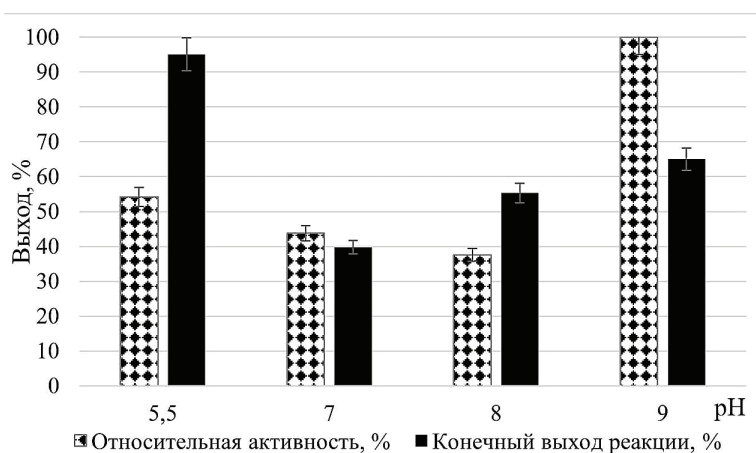


Рис. 7. График зависимости активности хитиназы и выхода реакции от pH реакционной среды

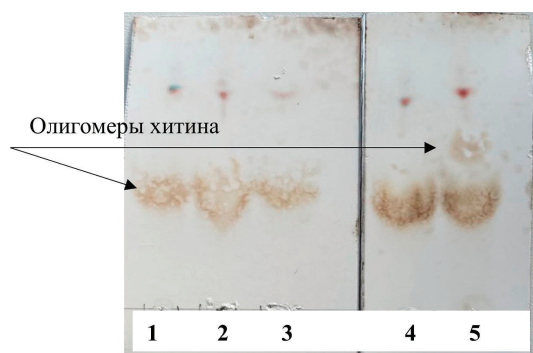


Рис. 8. ТСХ продуктов ферментативной реакции, визуализация 10%-ной серной кислотой: 1 — 20 мМ NaAc-буфер, pH 5,5; 2 — 20 мМ Трис-HCl-буфер, pH 7,0; 3 — 20 мМ Трис-HCl-буфер, pH 7,5; 4 — 20 мМ Трис-HCl-буфер, pH 8,0; 5 — 20 мМ Трис-HCl-буфер, pH 9,0

нейшего изучения [22]. Продуцирующая способность рекомбинантного штамма составила 382 ед/л КЖ.

Для выделенной хитиназы было определено два pH-оптимума, что также ранее было показано для других хитиназ [23–25]. Тем не менее в литературе описаны случаи отличия pH-оптимумов активности и стабильности хитиназ [26], что может быть причиной неполного гидролиза хитина при pH 9,0. Данное явление может быть объяснено ионизацией аминокислотных остатков в активном центре фермента, что влияет на конечный продукт реакции (рис. 8), а также стабильность и, соответственно, неполный гидролиз коллоидного хитина. Показанные рекомбинантные хитиназы, природным хозяином которых также выступали штаммы *B. licheniformis*, проявляли макси-

мальную активность в диапазоне температур 50–70 °С и характеризовались большей удельной активностью $15,67 \pm 0,37$ мкмоль/мг·мин при 50 °С [26] и $12,7$ мкмоль/мг·мин [27] на немодифицированном коллоидном хитине с 3,5-динитросалициловой кислотой. В работе [27] предлагается стратегия клонирования хитиназы ChiA в клетках *Pichia pastoris* совместно с экспрессией пяти генов шаперонов и последующим культивированием в ферментере. На данный момент это один из лучших результатов, которых удалось достичь для штаммов-продуцентов хитиназ.

Таким образом, нами показана возможность использования рекомбинантной хитиназы *B. licheniformis* для биodeградации хитина. Продемонстрирована возможность влияния pH буфера на конечный продукт гидролиза хитина, что позволяет получать олигомеры хитина с заданной длиной цепи.

Заключение

Методами генной инженерии был изолирован и клонирован ген, кодирующий хитиназу *B. licheniformis*. С использованием вектора pET42a(+) создана генетическая конструкция, несущая ген *chiB*, которой трансформирован штамм *E. coli* BL21 (DE3). Полученный рекомбинантный штамм способен продуцировать хитиназу и характеризуется продуцирующей способностью 382 ед/л КЖ. Изучена зависимость активности хитиназы и конечной степени гидролиза от pH среды, и показано влияние величины pH на получаемый конечный продукт. Полученные результаты могут быть

использованы для разработки технологии биодеградации хитина.

Список использованных источников

1. Younes, I. Chitin and chitosan preparation from marine sources. Structure, properties and applications / I. Younes, M. Rinaudo // *Marine Drugs*. – 2015. – Vol. 13, № 3. – P. 1133–1174. – doi: 10.3390/md13031133.
2. Upcycling chitin-containing waste into organonitrogen chemicals via an integrated process / X. Q. Ma, G. Gozaydin, H. Yang [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2020. – Vol. 117, № 14. – P. 7719–7728. – doi: 10.1073/pnas.1919862117.
3. Expression and molecular modification of chitin deacetylase from *Streptomyces bacillaris* / L. L. Yin, Q. Wang, J. Sun, X. Mao // *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, V. Sugumar, R. Varma, P. Nigariga // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 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, S. Ahmed, J. Hang [et al.] // *Carbohydrate Polymers*. – 2021. – Vol. 274. – Art. 118637. – doi: 10.1016/j.carbpol.2021.118637.
6. Zou, X. A gel diffusion assay for visualization and quantification of chitinase activity / X. Zou, H. Nonogaki, G. E. Welbaum // *Molecular Biotechnology*. – 2002. – Vol. 22, № 1. – P. 19–23.
7. Oyeleye, A. Chitinase: diversity, limitations, and trends in engineering for suitable applications / A. Oyeleye, Y. M. Normi // *Bioscience Reports*. – 2018. – Vol. 38, № 4. – Art. BSR2018032300.
8. Li, H. Sequence and structural analysis of the chitinase insertion domain reveals two conserved motifs involved in chitin-binding / H. Li, L. H. Greene // *PLoS One*. – 2010. – Vol. 5, № 1. – Art. e8654.
9. Beier, S. Bacterial chitin degradation-mechanisms and ecophysiological strategies / S. Beier, S. Bertilsson // *Frontiers in Microbiology*. – 2013. – Vol. 4. – Art. 149. – doi: 10.3389/fmicb.2013.00149.
10. Chitinolytic activity in *Serratia marcescens* (strain SEN) and potency against different larval instars of *Spodoptera litura* with effect of sublethal doses on insect development / C. Aggarwal, S. Paul, V. Tripathi [et al.] // *BioControl*. – 2015. – Vol. 60, № 5. – P. 631–640. – doi: 10.1007/s10526-015-9674-3.
11. Allosamidin, a chitinase inhibitor produced by *Streptomyces*, acts as an inducer of chitinase production in its producing strain / E. Nakanishi, S. Okamoto, H. Matsuura [et al.] // *Proceedings of the Japan Academy, Series B*. – 2001. – Vol. 77, № 5. – P. 79–82. – doi: 10.2183/pjab.77.79.
12. Molecular mechanism of *Trichoderma* as bio-control agents against phytopathogen system—a review / H. Gajera, R. Domadiya, S. Patel [et al.] // *Current Research in Microbiology and Biotechnology*. – 2013. – Vol. 1, № 4. – P. 133–142.
13. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains / T. Benitez, A. M. Rincon, M. C. Limon, A. C. Codon // *International Microbiology*. – 2004. – Vol. 7, № 4. – P. 249–260.
14. Isolation and characterization of chitinase from soil fungi, *Paecilomyces* sp. / M. Homthong, A. Kubera, M. Srihuttagam, V. Hongtrakul // *Agriculture and Natural Resources*. – 2016. – Vol. 50, № 4. – P. 232–242.
15. Fungal effectors in biotrophic, necrotrophic and hemibiotrophic pathosystems: A systematic review / T. A. Santos, D. C. B. de Rezende, A. S. Santos, C. P. Pirovani // *Plant Pathology*. – 2026. – Vol. 75, № 1. – Art. e70071.
16. Structural characteristics of an insect group I chitinase, an enzyme indispensable to moulting / L. Chen, T. Liu, Y. Zhou [et al.] // *Biological Crystallography*. – 2014. – Vol. 70, № 4. – P. 932–942. – doi: 10.1107/S1399004713033841.
17. Cloning and characterization of a small family 19 chitinase from moss (*Bryum coronatum*) / T. Taira, Y. Mahoe, N. Kawamoto [et al.] // *Glycobiology*. – 2011. – Vol. 21, № 5. – P. 644–654.
18. Conversion of chitin to defined chitosan oligomers: Current status and future prospects / C. Schmitz, L. Gonzalez Auza, D. Koberidze [et al.] // *Marine Drugs*. – 2019. – Vol. 17, № 8. – Art. 52.
19. Current perspectives on chitinolytic enzymes and their agro-industrial applications / V. Poria, A. Rana, A. Kumari [et al.] // *Biology*. – 2021. – Vol. 10, № 12. – Art. 1319.
20. Park, B. K. Applications of chitin and its derivatives in biological medicine / B. K. Park,

- M. M. Kim // International Journal of Molecular Sciences. – 2010. – Vol. 11, № 12. – P. 5152–5164. – doi: 10.3390/ijms11125152.
21. Wirth, S. J. Dye-labelled substrates for the assay and detection of chitinase and lysozyme activity / S. J. Wirth, G. A. Wolf // Journal of Microbiological Methods. – 1990. – Vol. 12, № 3–4. – P. 197–205.
22. Schwimmer, S. Theory of double pH optima of enzymes / S. Schwimmer // Journal of Theoretical Biology. – 1962. – Vol. 3, № 1. – P. 102–110. – doi: 10.1016/S0022-5193(62)80006-X.
23. Isolation and characterization of thermostable chitinases from *Bacillus licheniformis* X-7u / T. Takayanagi, K. Ajisaka, Y. Takiguchi [et al.] // Biochim. Biophys. Acta, Protein Struct. Mol. Enzymol. – 1991. – Vol. 1078, № 3. – P. 404–410.
24. Cloning, sequencing, and expression of the chitinase gene chiA74 from *Bacillus thuringiensis* / J. Eleazar Barboza-Corona, E. Nieto-Mazzocco, R. Velázquez-Robledo [et al.] // Appl. Environ. Microbiol. – 2003. – Vol. 69, № 2. – P. 1023–1029. – doi: 10.1128/AEM.69.2.1023-1029.2003.
25. Kudan, S. Purification and characterization of thermostable chitinase from *Bacillus licheniformis* SK-1 / S. Kudan, R. Pichyangkura // Appl. Biochem. Biotechnol. – 2009. – Vol. 157, № 1. – P. 23–35. – doi: 10.1007/s12010-008-8328-7.
26. Expression and characterization of *Bacillus licheniformis* chitinase (ChiA), suitable for bioconversion of chitin waste / C. Songsiriritthigul, S. Lapboonrueng, P. Pechsrichuang [et al.] // Bioresour. Technol. – 2010. – Vol. 101, № 11. – P. 4096–4103.
27. Multiple strategies to improve the yield of chitinase a from *Bacillus licheniformis* in *Pichia pastoris* to obtain plant growth enhancer and GlcNAc / W. Song, N. Zhang, M. Yang [et al.] // Microb. Cell Fact. – 2020. – Vol. 19, № 1. – Art. 181. – doi: 10.1186/s12934-020-01440-y.

М. А. Vinter, А. I. Zinchenko

OBTAINING RECOMBINANT *BACILLUS LICHENIFORMIS* CHITINASE IN *ESCHERICHIA COLI* CELLS

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

A recombinant chitinase-producing *Escherichia coli* strain was created. The obtained strain is characterized by a producing capacity in relation to chitinase amounting to 382 U/l of culture fluid. A Coomassie R-250-labeled colloidal chitin conjugate, allowing spectrophotometric measurement of chitinase activity, was synthesized. The effect of buffer pH on enzyme activity, the final degree of chitin hydrolysis, and the resulting product was studied. The results obtained can be used to develop chitin biodegradation technology.

Keywords: recombinant bacterium, chitin, chitinase, *Escherichia coli*, *Bacillus licheniformis*.

Дата поступления в редакцию: 04 февраля 2026 г.

А. И. Царь

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИДЕНТИФИКАЦИИ РЫБ СЕМЕЙСТВА ЛОСОСЕВЫЕ (*SALMONIDAE*)

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

Семейство лососевых (*Salmonidae*) является одной из важнейших групп рыб как в промысле, так и в окружающей среде. Его представители нуждаются в чистой, богатой кислородом воде и служат индикаторами состояния экосистем. Данное семейство разделяется на две основные группы: атлантическую и тихоокеанскую. Атлантический лосось, также известный как семга (*Salmo salar*), относится к роду лососей. Тихоокеанский лосось включает в себя несколько видов, таких как горбуша (*O. gorbuscha*), кета (*O. keta*), нерка (*O. nerka*), кижуч (*O. kisutch*), чавыча (*O. tshawytscha*) и другие. Эта классификация основана на географическом ареале обитания. Различие между близкородственными видами лососевых и выявление гибридизации критически важно для охраны природы, сохранения диких видов, управления аквакультурой и предотвращения фальсификаций рыбной продукции. Современные молекулярно-генетические методы (ПЦР, ДНК-баркодирование, секвенирование генома, SNP-микрочипирование, картирование QTL) позволяют точно идентифицировать виды, выявлять гибриды и связывать генетические варианты с признаками роста и полового созревания, что, несомненно, важно для устойчивого воспроизводства рыбных ресурсов и бережного природопользования.

Ключевые слова: семейство лососевые (*Salmonidae*), ПЦР, картирование QTL, ДНК-баркодирование, секвенирование генома, SNP-микрочипы.

Для цитирования: Царь, А. И. Молекулярно-генетические методы идентификации рыб семейства лососевые (*Salmonidae*) / А. И. Царь // Молекулярная и прикладная генетика: сб. науч. тр. / Ин-т генетики и цитологии НАН Беларуси; редкол.: А. В. Кильчевский (гл. ред.) [и др.]. – Минск, 2026. – Т. 40. – С. 100–108.

Введение

Рыбы семейства лососевых (*Salmonidae*) являются одними из наиболее важных промысловых рыб, которые обитают в умеренных, субарктических и арктических водах. Особое значение имеют представители таких родов, как тихоокеанский лосось (*Oncorhynchus*), лосось (*Salmo*), голец (*Salvelinus*), насчитывающие более 110 видов подсемейства Salmoninae. Они обитают как в естественных условиях, так и культивируются по всей территории Северного и Южного полушарий. В то время как некоторые виды живут только в пресной воде, многие лососи являются проходными видами во взрослой стадии, которые возвращаются из океана в пресноводные проточные водоемы на нерест [1]. Все лососевые рыбы нуждаются в чистой, насыщенной кислородом воды, что позволяет рассматривать их в качестве инди-

каторов состояния экосистем и происходящих в них изменений [2].

Многие виды, обычно называемые лососем, имеют коммерческое значение, что инициировало значительное число исследований по изучению их биологии и экологии. В этой группе представлено шесть видов тихоокеанских лососей (род *Oncorhynchus*), а именно: радужная форель (*O. mykiss*), нерка (*O. nerka*), горбуша (*O. gorbuscha*), кета (*O. keta*), чавыча (*O. tshawytscha*) и кижуч (*O. kisutch*), а также благородные лососи (род *Salmo*): атлантический лосось (*S. salar*) и кумжа (*S. trutta*) [3].

Для атлантического лосося — семги (*Salmo salar*) — доля коммерческого дикого промысла относительно невелика, так как этот вид активно используется как объект аквакультуры. Максимальный возраст атлантического лосося составляет 11–13 лет. На нерест лосо-

севые возвращаются в возрасте трех-пяти лет. Семга — проходной вид, образующий в больших озерах пресноводную форму. Во время нагула в море лосось питается мелкой рыбой и ракообразными. Держится он недалеко от берегов, на глубинах не более 120 м. Растет очень быстро, увеличиваясь за год более чем на 20 см, а достигнув половой зрелости, семга начинает движение к нерестовым рекам [4].

Выращивание лосося является важным сектором в мировой рыбной промышленности с производством более чем 2 млн т ежегодно [5]. Это существенно больше, чем ловят в дикой природе в рамках коммерческого промысла всех видов лососей вместе взятых. Между тем культивируемые лососевые, в отличие от обитающих в естественных условиях, живут в ограниченном пространстве и испытывают гиподинамию. Это оказывает непосредственное влияние на химический состав их тканей и обуславливает недостаточную плотность и снижение упругости мышечных волокон. В результате при переработке рыбного сырья происходит расслоение мышечной ткани по миомертам, что снижает товарное качество продукта. Исходя из этого, важно определить популяционную принадлежность атлантического лосося как «дикого» или выращенного в аквакультуре [6].

Точная идентификация видов является краеугольным камнем охраны природы, однако визуально различать близкородственные виды сложно [7]. Например, два вида лососевых с перекрывающимися ареалами и местообитаниями — атлантический лосось (*S. salar*) и озерная форель (*S. trutta*); красногорлый лосось (*O. clarki*) и радужная форель (*O. mykiss*) — трудно различимы визуально, особенно на ранних стадиях развития [8]. Кроме того, наличие гибридов между такими близкородственными парами видов усложняет точную идентификацию. Гибридизация может снижать приспособленность, жизнеспособность и продуктивность популяций из-за интрогрессии нежелательных генов [9]. Таким образом, близкородственная гибридизация может иметь важные экологические и эволюционные последствия и представляет собой серьезную задачу сохранения видов, особенно для небольших популяций [8].

Гибриды атлантического лосося и озерной

форели функционально стерильны либо в первом, либо во втором поколении [9]. Антропогенные факторы, такие как регулирование рек (например, изменение режима стока ниже плотин и последующие управленческие регулировки) и ограничения площадей нереста в сочетании с обычно ограниченным числом нерестующих особей (дефицитом потенциальных партнеров), могут повышать уровень гибридизации между популяциями лосося и форели, что подчеркивает необходимость их постоянного мониторинга [8]. Существующие визуальные методы идентификации гибридов лосося и форели требуют экспертных знаний и не всегда точны [9]. Например, известно, что эмбрионы форели обычно крупнее из-за более ранних сроков нереста по сравнению с атлантическим лососем, однако распределение их по размеру на ранних стадиях развития весьма неоднозначно [7].

Значительные различия в стоимости лососевых рыб разных видов создают базу для фальсификации продукции. Ассортиментная фальсификация рыбных продуктов осуществляется путем полной или частичной замены одного более ценного (как в пищевом отношении, так и в материальном выражении) вида рыбы на другой — менее ценный. Рыбы семейства лососевых часто фальсифицируются, т. к. анатомо-морфологические признаки разных видов этого семейства имеют определенное сходство, а различия между видами могут распознать только высококвалифицированные специалисты или лица, занимающиеся уловом и переработкой лососевых. На практике чаще всего встречается подмена мяса семги радужной форелью, а кеты — горбушей. Также отличаются по ценности и вкусовым качествам виды красной икры, получаемые из горбуши, кеты, форели, кижуча [10].

В связи с этим активно развиваются исследования по разработке методик видовой идентификации сырья и компонентов пищевых продуктов водного промысла с использованием молекулярно-генетического анализа.

Методы идентификации видов рыб

Метод идентификации видов рыб по морфологическим признакам является традиционным, используемым как в экологическом мониторинге, так и в промышленной ловле

и торговле. Однако этот метод имеет ряд ограничений, если подвергшиеся воздействию образцы имеют неярко выраженные, поврежденные или же отсутствующие ключевые морфологические признаки идентификации. Кроме того, некорректная идентификация может происходить по причине внутривидовой фенотипической пластичности признака или его вариации как у взрослых особей, так и у личиночных [11].

Начиная с конца прошлого века был разработан ряд методов лабораторного определения видовой принадлежности рыб. В большинстве своем они основывались на разделении белков в ходе электрофореза или высокоэффективной жидкостной хроматографии, в результате чего получались специфичные белковые профили. Также существуют методики идентификации на основе иммунопреципитации [12]. Тем не менее если процесс приготовления включает этапы термической обработки (копчение, жарка, варка и т. д.), происходит необратимая денатурация специфичных белков, что делает подобные методы идентификации мало конкурентноспособными [12].

В настоящее время молекулярно-генетические методы получают все большую популярность и применимость в мировой практике рыбоводства, переработки рыбного сырья и пищевой промышленности. ДНК-идентификация видов применяется к продуктам различной степени переработки [3]. Открытые базы данных по генетическим последовательностям способствуют разработке методик идентификации видов [13]. Довольно часто используется ДНК-баркодинг для идентификации морских видов в продуктах питания [14]. Постоянно разрабатываются новые ДНК-маркеры и совершенствуются существующие методики для более точной идентификации видов.

Методы, основанные на ПЦР

Работы по разработке молекулярно-генетических методов идентификации видов рыб семейства лососевых начаты в 90-х гг. прошлого столетия. В статье Bernatchez и Danzmann представлены исследования соответствия последовательности контрольной области и вариаций сайтов рестрикции в митохондриальной ДНК ручьевой форели (*Salvelinus fontinalis*).

Авторами сравнивается генетическое разнообразие и филогенетические взаимоотношения между гаплотипами митохондриальной ДНК, обнаруженное с помощью анализа фрагментов рестрикции [15].

Анализ митохондриальной ДНК, проведенный Nielsen, выявил сложную генетическую структуру популяций атлантического лосося (*S. salar*) в Дании. Исследование показало генетические взаимосвязи между датскими и другими европейскими популяциями лосося. Это предполагает разнообразную генетическую структуру, которая важна для понимания эволюции и сохранения этих видов. Анализ митохондриальной ДНК является важным инструментом для изучения генетической структуры и филогеографии атлантического лосося [16].

В работе Rasmussen с соавторами описана методика мультиплексной ПЦР для идентификации коммерчески важных видов лосося и форели в Северной Америке (роды *Oncorhynchus* и *Salmo*), которая позволяет эффективно различать близкородственные виды, повышая точность контроля за рыбной продукцией [17]. Разработанная авторами методика мультиплексной ПЦР дает возможность идентифицировать семь коммерчески значимых видов лосося и форели в формате ПЦР в реальном времени. Панель маркеров позволяет быстро определить вид, что занимает примерно 2 ч в ПЦР в режиме реального времени [17].

Во избежание недобросовестной конкуренции на рынке и для защиты потребителей от ложных наименований продуктов, которые обычно принимаются по экономическим, религиозным и медицинским причинам, требуется разработка надежных и чувствительных аналитических инструментов, облегчающих рутинные контрольные испытания состава различных продуктов питания и кормов животного и растительного происхождения. С этой целью разработаны методы анализа ДНК на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР), которые дают возможность точной детекции компонента продукта, принадлежащего к определенному биологическому виду, даже для продуктов, подвергшихся интенсивной обработке, а также продуктов с комплексом компонентов [18].

Для разработки биотехнологии идентифи-

кации биоматериала лососевых использованы видоспецифичные праймеры к последовательности митохондриального гена, кодирующего субъединицу I оксидазы цитохрома с (*COI*) семейства лососевых [17]. Наличие специфического продукта реакции соответствующего размера с ДНК-матрицей образца свидетельствует о видовой принадлежности биологического материала [17].

В работе В. А. Лемеш с соавторами применены видоспецифичные маркеры, которые позволили в ходе ПЦР-анализа установить и подтвердить видовую принадлежность более 40 образцов продукции из красной рыбы, различающихся по способу обработки исследуемой ткани и типу биологического материала. Данная система ПЦР успешно различает целевые виды даже в сильно переработанных пищевых продуктах. По сравнению с баркодингом и секвенированием данная методика представляет собой существенную экономию средств и времени [18].

Методы, нацеленные на различия в однонуклеотидных полиморфизмах (SNP, Single Nucleotide Polymorphism), такие как конкурентная аллель-специфичная ПЦР (KASP, Kompetitive Allele-Specific PCR) [19], являются быстрыми, экономичными и широко применяются в экологических и эволюционных исследованиях [20]. KASP-технологии применили для обнаружения полиморфизмов в отдельных генах у лососевых [21]. Эти методы также подходят для различения двух близкородственных видов, используя фиксированные однонуклеотидные различия между ними [22].

В исследовании Tutku Aykanat с соавторами описан рабочий процесс разработки и валидации KASP-маркеров для идентификации видов и гибридов рыб семейства лососевые. Разработанный тест надежно различал два близкородственных вида лососевых — атлантического лосося и озерную форель, а также их гибридов, — и делал это быстрее и экономичнее, чем методы, основанные на анализе полиморфизма длины фрагментов [7].

В работе L. A. Zhivotovsky с соавторами рассматривается использование универсальных праймеров для амплификации микросателлитных маркеров для различных видов лососевых рыб. Это позволяет решать проблемы идентификации видов, выявления ги-

бридов и оценки генетического разнообразия. Приводятся доводы в пользу данного метода по сравнению с ДНК-баркодированием, поскольку он способен регистрировать высокую внутривидовую полиморфность и упрощает анализ. Кроме того, ДНК-баркодирование, основанное на анализе последовательности *COI*, имеет ограничения в идентификации отдельных особей и оценке популяции. Показано, что микросателлитные маркеры имеют преимущество благодаря высокой полиморфности и простоте генотипирования. В исследовании были испытаны 14 микросателлитных локусов, из которых только восемь показали стабильную амплификацию при использовании одинаковых праймеров для нескольких видов. Идентификация видов и определение индивидуальности образцов обеспечиваются низкой вероятностью случайного совпадения генотипов [23].

ДНК-баркодирование рыб семейства лососевых

ДНК-баркодирование быстро утвердилось как мощный инструмент для идентификации видов у широкого круга организмов, включая рыб. Ориентируясь на короткий стандартизованный регион митохондриального генома — обычно фрагмент гена *COI* (цитохром-с-оксидазы I) длиной 652–655 пар оснований, — исследователи разработали видоспецифичные молекулярные «ярлыки», позволяющие быстро и точно определять видовую принадлежность. Хотя первоначальные исследования были сосредоточены на морских и пресноводных рыбах, разработанные методики применимы к лососевым, которые известны сложностью жизненных циклов и высоким коммерческим значением.

ДНК-баркодирование основывается на принципе, что генетические дистанции внутри вида, как правило, существенно ниже, чем между близкородственными видами. В контексте идентификации рыб митохондриальный ген *COI* демонстрирует низкую изменчивость среди особей одного вида и значительное расхождение между разными видами. Эти различия обеспечивают надежную основу для идентификации видов на основе их ДНК-баркодов.

К видам рыб семейства лососевых, вклю-

чая атлантического и тихоокеанского лосося, успешно применялись методы ДНК-баркодирования. Канадское исследование, включавшее 1360 особей из 190 видов пресноводных рыб (95% известной фауны), продемонстрировало высокую точность идентификации видов по баркодам *COI* [24]. Учитывая высокую экономическую ценность лососевых для коммерческого рыболовства и аквакультуры, возможность точной идентификации на всех стадиях жизненного цикла (от икры до взрослых особей) имеет критическое значение. ДНК-баркодирование зарекомендовало себя как точный инструмент для выявления подмены видов в торговых цепочках, устойчивого управления дикими популяциями и содействия сохранению экосистем.

Исследование R. S. Rasmussen с соавторами посвящено возможности ДНК-штрихкодирования для надежной идентификации семи коммерчески важных видов родов *Oncorhynchus* и *Salmo* в Северной Америке. В ходе анализа было собрано более 1000 образцов лососевых, секвенированных для стандартного региона ДНК-баркода (*COI*). Установлено, что виды обладают значительной межвидовой вариацией (в среднем 8,22%) по сравнению с низкой внутривидовой вариацией (в среднем 0,26%), что делает ДНК-баркодирование надежным методом их идентификации. Все исследуемые виды показали отсутствие перекрывающихся баркодов, что исключает возможность гибридизации между ними. Кроме того, в результате анализа были выявлены несколько мини-баркодов, способных эффективно различать все семь исследуемых видов. Эта работа демонстрирует пригодность ДНК-штрихкодирования в рыбоводстве и торговле для точной идентификации видов [17].

Преимуществами ДНК-баркодирования являются оперативность, стандартизация между исследованиями и высокая точность при наличии исчерпывающих референтных баз данных. Вместе с тем сохраняются определенные ограничения, такие как вероятность перекрытия генетических дистанций в случаях недавнего видообразования или наличия криптических таксонов. При малых средних генетических дистанциях между сестринскими видами ген *COI* может не обеспечить достаточного разрешения для однозначной

идентификации. Наличие общего полиморфизма между сестринскими видами требует применения дополнительных методов, таких как интеграция ядерных маркеров или более масштабных геномных подходов [24]. Несмотря на эти трудности, ДНК-баркодирование остается краеугольным методом молекулярной идентификации для лососевых и других рыб.

Секвенирование полного генома рыб семейства лососевых

В то время как ДНК-баркодирование ориентировано на один митохондриальный ген, геномные подходы опираются на более объемные наборы данных, позволяющие учитывать сложность генома лососевых. С быстрым развитием технологий секвенирования следующего поколения (NGS, Next-Generation Sequencing) полногеномный анализ стал практичным инструментом для изучения эволюционной динамики, структурных перестроек и генетической архитектуры ключевых признаков у лососевых.

Отличительной особенностью геномов лососевых является полная дупликация генома (Ss4R), произошедшая примерно 80 млн лет назад [25]. Это привело к ауотетраплоидной структуре генома, которая в современном состоянии лишь частично диплоидизирована. Вследствие этого маркеры, позволяющие различать гомологичные и гомеологичные регионы, требуют тщательной обработки при геномных анализах. Проект по секвенированию генома атлантического лосося подчеркивает значимость этой дупликации. Сборка референсного генома атлантического лосося охватывает большинство кодирующих белки генов и дает представление о паттернах редиплоидизации — процессе, в ходе которого продублированный геном частично возвращается к диплоидному состоянию [25].

Использование одиночных нуклеотидных полиморфизмов (SNP) открыло новые возможности для выявления генетических маркеров, связанных с ключевыми признаками у атлантического лосося [26]. SNP-микрочипы позволяют всесторонне генотипировать крупные популяции, способствуя выявлению ассоциаций между генетическими вариантами и сложными признаками, такими как скорость роста и половое созревание [26]. Например, иссле-

дование А. Р. Gutierrez с соавторами, в котором применялся полногеномный поиск ассоциаций (GWAS, Genome-Wide Association Study) у атлантического лосося для генотипирования почти 480 особей, выявило несколько SNP, статистически значимо связанных с признаками роста и созревания. Несмотря на то что авторы указывали на ограниченную точность определения некоторых маркеров из-за низкой степени сцепления (linkage disequilibrium) и малой плотности маркеров, результаты демонстрируют потенциал использования SNP-маркеров в селекционных программах [26].

На рисунке представлена схема идентификации рыб семейства лососевых. На первом этапе происходит сбор образцов для анализа. После секвенирования выполняются сбор и анализ данных, которые необходимы для разработки SNP-микрочипов для генотипирования и интерпретации данных.

Сочетание секвенирования полного генома и генотипирования по SNP-микрочипам обеспечивает получение беспрецедентной глубины данных в геномных исследованиях лососевых. Это не только улучшает понимание сложной эволюционной истории видов, но и предоставляет практические инструменты для аквакультуры. Геномная информация применяется для оптимизации программ селекции путем выявления благоприятных аллелей,

связанных с устойчивостью к болезням, скоростью роста и временем созревания. Такие молекулярные данные важны для разработки стратегий, обеспечивающих устойчивое рациональное рыболовство.

В исследовании V. Bourret с соавторами была разработана SNP-панель средней плотности для атлантического лосося, которая основывалась на экспрессированных последовательностях генов (ESTs). Исследование раскрывает геномные паттерны отбора и интрогрессии у атлантического лосося, что позволяет лучше понять генетическую структуру и эволюцию этого вида. Использование SNP-панели позволяет исследовать генетические вариации в широком масштабе генома [27].

Картирование QTL и маркерные подходы, ориентированные на фенотипические признаки

Помимо методов, охватывающих весь геном, картирование локусов количественных признаков (QTLs, Quantitative Trait Loci) и исследования, ориентированные на специфические маркеры, играют ключевую роль в установлении связи между генетической вариацией и фенотипическими признаками у лососевых. Эти методы позволяют выявлять участки генома, содержащие гены, ответственные за важные признаки, такие как скорость роста, половое

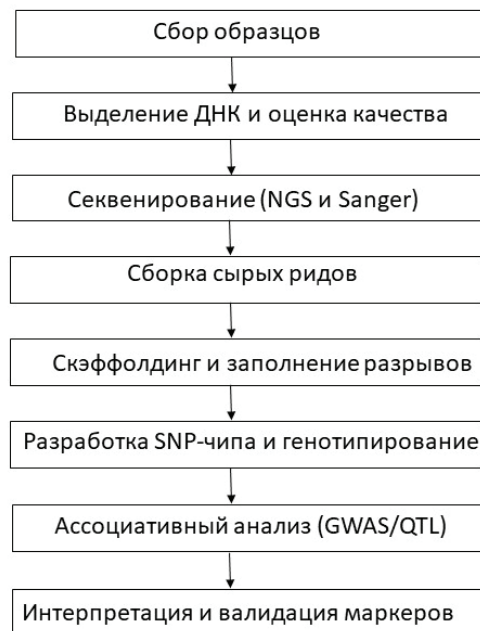


Рис. Полная схема идентификации рыб семейства лососевых

созревание и поведение в период нереста.

Картирование QTL предполагает идентификацию геномных регионов, ассоциированных с количественными признаками, путем корреляции фенотипической вариации с генетическими маркерами. GWAS у атлантического лосося, направленное на изучение скорости роста и полового созревания, продемонстрировало полезность этого подхода, выявив ограниченное число маркеров с существенными ассоциациями [26]. Например, маркер на хромосоме 13 (Ssa13) статистически связан с показателями роста. Аналогично, маркеры, ассоциированные с ранним половым созреванием, были обнаружены на хромосомах Ssa28 и Ssa01 [26].

Интеграция данных как геномного масштаба, так и целевых маркерных исследований обеспечивает всестороннее понимание генетики лососевых. В то время как секвенирование полного генома и SNP-микрочипы дают широкое представление о структуре генома и эволюционной истории, микросателлиты и QTL фокусируются на конкретных областях, критичных для экономически значимых признаков. Сочетание этих подходов способствует повышению эффективности как идентификации свободноживущих диких видов, так и разработки селекционных программ.

Заключение

Рыбы семейства лососевых представляют собой одну из наиболее экономически и экологически значимых групп рыб. Их большое видовое разнообразие, миграционный образ жизни и ключевые роли в аквакультуре и охране природы стимулировали разработку современных молекулярно-генетических методов для идентификации видов. В последние годы различные молекулярные подходы, включая ДНК-баркодирование, секвенирование полного генома, SNP-микрочипы и картирование QTL, в корне преобразовали наше представление о биологии лососевых. Эти методы не только обеспечивают точную идентификацию на уровне видов, но и дают представление о внутривидовой вариабельности, структуре популяций и эволюционной истории. Молекулярно-генетические исследования имеют прикладное значение в охране природы и управлении аквакультурой. Современные

молекулярные методы идентификации позволяют проводить мониторинг диких популяций, помогают выявлять незаконную торговлю и подмену в маркировке продукции, а также способствуют улучшению программ селекции в аквакультуре. Сочетание нескольких методов генетической идентификации позволяет наиболее точно и полно установить видовую принадлежность рыб. Интеграция геномных инструментов в практику гарантирует повышение устойчивости и продуктивности рыбной отрасли.

Список использованных источников

1. Woo, P. T. K. Salmon: biology, ecological impacts and economic importance: Fish, fishing, and fisheries. Salmon / P. T. K. Woo, D. Noakes. – New York: Nova Publishers, 2014. – 347 p.
2. Гребенюк, А. Особенности химического состава и показатели свежести лососевых рыб аквакультуры Норвегии и Карелии / А. Гребенюк, Ю. Базарнова // Научный Журнал НИУ ИТМО. Серия «Процессы И Аппараты Пищевых Производств». – 2012. – Т. 2. – С. 12.
3. Rasmussen, R. S. DNA Barcoding of Commercially Important Salmon and Trout Species (*Oncorhynchus* and *Salmo*) from North America / R. S. Rasmussen, M. T. Morrissey, P. D. N. Herbert // J. Agric. Food Chem. – 2009. – Vol. 57, № 18. – P. 8379–8385.
4. Мартынов, В. Г. Атлантический лосось (*Salmo salar* L.) на Севере России: структура популяций, экология, хозяйственное значение / В. Г. Мартынов. – Екатеринбург: УрО РАН, 2007. – С. 232.
5. Contributing to food security and nutrition for all: The state of world fisheries and aquaculture / FAO. – Rome: The State of World Fisheries and Aquaculture, 2016. – 200 p.
6. Bermingham, E. Discrimination between Atlantic salmon (*Salmo salar*) of North American and European origin using restriction analyses of mitochondrial DNA / E. Bermingham, S. H. Forbes, K. Friedland // Can. J. Fish. Aquat. Sci. – 1991. – Vol. 48. – P. 884–893.
7. Fast and cost-efficient species identification of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.), brown trout (*Salmo trutta*), and their hybrids using a single SNP marker / T. Aykanat, A. Balatsou, K. Kähkönen [et al.] // J Fish Biol. – 2024. – Vol. 106, № 4. – P. 1240–1244.

8. The problems with hybrids: setting conservation guidelines / W. F. Allendorf, R. F. Leary, P. Spruell [et al.] // *Trends in Ecology & Evolution*. – 2001. – Vol. 16, № 11. – P. 613–622.
9. Makhrov, A. A. Hybridization of the Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and brown trout (*S. trutta* L.) / A. A. Makhrov // *Zoological Institute St. Petersburg: Zoosystematica Rossica*. – 2008. – Vol. 17, № 2. – P. 129–143.
10. Rasmussen, R. S. DNA-based methods for the identification of commercial fish and seafood species / R. S. Rasmussen, M. T. Morrissey // *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. – 2011. – Vol. 10, № 2. – P. 66–80.
11. Evaluating the accuracy of morphological identification of larval fishes by the metabarcoding method / H. L. Ko, Y. T. Wang, T. S. Chiu [et al.] // *PLoS One*. – 2013. – Vol. 8, № 1. – P. 53451.
12. Differentiation of smoked *Salmo salar*, *Oncorhynchus mykiss* and *Brama raii* using the nuclear marker 5S rDNA / E. Carrera, T. García, A. Céspedes [et al.] // *Int. J. Food Sci. Technol.* – 2000. – Vol. 35, № 4. – P. 401–406.
13. Zanzi, A. FishTrace: a genetic catalogue of European fishes / A. Zanzi, J. Th Martinsohn // *Database*. – 2017. – Vol. 2017. – P. 1–11.
14. DNA barcoding validates species labelling of certified seafood / J. Barendse, A. Roel, C. Longo [et al.] // *Current Biology*. – 2019. – Vol. 29, № 6. – P. 198–199.
15. Bernatchez, L. Congruence in control-region sequence and restriction-site variation in mitochondrial DNA of brook charr (*Salvelinus fontinalis*) / L. Bernatchez, R. G. Danzmann // *Molecular Biology and Evolution*. – 1993. – Vol. 10, № 5. – P. 1002–1014.
16. Nielsen, E. Eg Genetic structure of salmonid fish populations: Spatial and temporal genetic differentiation in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and brown trout (*Salmo trutta* L.) / E. Eg Nielsen // *Denmark: University of Aarhus*. – 1997. – 82 p.
17. Rasmussen, R. S. A Multiplex PCR Method for the Identification of Commercially Important Salmon and Trout Species (*Oncorhynchus* and *Salmo*) in North America / R. S. Rasmussen, M. T. Morrissey, R. H. Hanner // *J. Food Sci.* – 2010. – Vol. 75, № 7. – P. 595–606.
18. Технология генетической идентификации видов лососевых в рыбном сырье и продуктах питания (семга, радужная форель, горбуша, кижуч, кета, нерка): метод. рекомендации / В. А. Лемеш [и др.]; Национальная академия наук Беларуси, Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, Институт рыбного хозяйства. – Минск, 2019. – 24 с.
19. Single nucleotide polymorphism genotyping using Kompetitive allele specific PCR (KASP): Overview of the technology and its application in crop improvement / K. Semagn, R. Babu, S. Hearne, M. S. Olsen // *Molecular Breeding*. – 2013. – Vol. 33. – P. 1–14.
20. Wenne, R. Single nucleotide polymorphism markers with applications in conservation and exploitation of aquatic natural populations / R. Wenne // *Animals (Basel)*. – 2023. – Vol. 13, № 6. – 1089 p.
21. Genetic coupling of life-history and aerobic performance in Atlantic salmon / J. M. Prokkola, E. Åsheim, S. Morozov [et al.] // *Proc: Biol. Sci.* – 2022. – Vol. 289, № 1967. – P. 20212500.
22. Çatalkaya, M. Development of SNP-based assays for identification of *Globodera rostochiensis* and *Globodera pallida* / M. Çatalkaya, A. Göknur, Z. Devran // *Journal of Plant Diseases and Protection*. – 2023. – Vol. 130, № 294. – P. 1041–1048.
23. Zhivotovsky, L. A. Identification of salmonid fish using microsatellite markers with identical PCR-primers / L. A. Zhivotovsky, E. G. Shaikhaev, M. V. Shitova // *Russ. J. Mar. Biol.* – 2013. – Vol. 39, № 6. – P. 447–454.
24. Identifying Canadian Freshwater Fishes through DNA Barcodes / N. Hubert, R. Hanner, E. Holm [et al.] // *PLoS ONE*. – 2008. – Vol. 3, № 6. – P. 2490.
25. The Atlantic salmon genome provides insights into rediploidization / L. Sigbjørn, B. F. Koop, S. R. Sandve [et al.] // *Nature*. – 2016. – Vol. 533, № 7602. – P. 200–205.
26. Genome-wide association study (GWAS) for growth rate and age at sexual maturation in Atlantic salmon (*Salmo salar*) / A. P. Gutierrez, J. M Yáñez, S. Fukui [et al.] // *PLoS ONE*. – 2015. – Vol. 10, № 3. – P. 0119730.
27. SNP-array reveals genome-wide patterns of geographical and potential adaptive divergence across the natural range of Atlantic salmon (*Salmo salar*) / V. Bourret, M. P. Kent, C. R. Primmer [et al.] // *Molecular Ecology*. – 2013. – Vol. 22, № 3. – P. 532–551.

N. I. Tsar

MOLECULAR GENETIC IDENTIFICATION TECHNIQUES FOR *SALMONIDAE*

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

The salmon family (*Salmonidae*) is one of the most important groups of fish, both commercially and ecologically. Its representatives require clean, oxygenated water and serve as indicators of ecosystem health. Members of this family are divided into two main groups: Atlantic and Pacific. Atlantic salmon, also known as *Salmo salar*, belong to the genus *Salmonidae*. Pacific salmon include several species, including pink salmon (*O. gorbuscha*), chum salmon (*O. keta*), sockeye salmon (*O. nerka*), coho salmon (*O. kisutch*), Chinook salmon (*O. tshawytscha*), and others. This classification is based on geographic range. Distinguishing between closely related salmon species and identifying hybridization are critical for conservation, preserving wild species, managing aquaculture, and preventing fish product fraud. Modern molecular genetic methods (PCR, DNA barcoding, genome sequencing, SNP microarray, QTL mapping) allow for the precise identification of species, the detection of hybrids, and the association of genetic variants with growth and sexual maturation traits, which is undoubtedly important for the sustainable reproduction of fish resources and careful nature management.

Keywords: *Salmonidae* family, PCR, QTL mapping, DNA barcoding, genome sequencing, SNP-array.

Дата поступления в редакцию: 02 февраля 2026 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 (первые буквы предложений заглавными, а остальные — строчными)*, 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*; пример: Государственное научное учреждение «Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси») располагается по центру, набирается прямым начертанием. На следующей строке указывается почтовый адрес учреждения (в следующем порядке: 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. Аннотация

Располагается после места работы авторов, набирается прямым начертанием.

Аннотация должна 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, без длинных исторических введений и повторений. **ЗАПРЕЩЕНО** дублировать части текста предыдущих изданных статей, текст должен быть оригинальным.

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

Вставка в текст символов (например, β , ϵ) производится только через опцию *Вставка/Символ*. Для набора надстрочных и подстрочных символов (C^2 , C_4) использовать меню *Шрифт/Надстрочный знак/Подстрочный знак*.

Общие правила набора текста

Не допускается использование буквы ё. За исключением написания в собственных именах (фамилиях, географических названиях) и для предупреждения неправильного опознания слова (всё, нёбо, совершённый). В русских текстах разделитель целой и дробной части числа — запятая.

Прямое (не курсивное) начертание должны иметь:

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

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

Без пробелов следует проставлять:

- 1) дефис (-) в сложных словах (минерал-индикатор, К-пространство) и при наращении падежных окончаний к цифрам и буквам (1-го, j-го);
- 2) короткое тире (—) (Ctrl + «-» на нумерационной клавиатуре) между цифрами, обозначающими пределы какой-либо величины (20–30 чел., 1980–1999 гг.);
- 3) знаки -, +, ≤, > в значении положительной или отрицательной величины, степени увеличения или уменьшения (+30, составляет >80);
- 4) знак % (80%);
- 5) скобки () и кавычки «» от заключенных в них слов (кавычки в в тексте на русском и белорусском языках должны быть одного рисунка — «елочки», в английском языке — “лапки”).

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 числа, содержащие 5 и более знаков, разбиваются по три цифры справа на лево (10 000, 1 000 000, 1 888,88, но 1000);
- 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

Рисунки должны размещаться только после их первого упоминания в тексте статьи. **Не допускается** размещение рисунков в конце статьи (в последнем абзаце перед заключением). Если ссылка на рисунок включена в предложение, используется полное написание — рисунок 1; если слова заключаются в скобки, используется сокращение — (рис. 1).

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

Рисунки должны быть представлены в электронном виде отдельными файлами в следующих форматах: JPEG, TIFF, PNG.

Не допускается использование скриншотов всего рабочего стола (должна отображаться только значимая информация, без лишних элементов).

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. Все надписи на рисунках **должны быть набраны** Times New Roman 10 пт.

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 первого 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 после «**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.

Не допускается размещение таблиц в конце статьи (в последнем абзаце перед заключением).

Информация о соблюдении требований Нагойского протокола

Если работа связана с исследованиями, в которых в качестве объекта используются генетические ресурсы (растения, животные, микроорганизмы), полученные от зарубежных партнеров, 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 разделе «Заключение» 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 (в редакции приказа ВАК Республики Беларусь от 13.10.2025 № 206) (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. Пример оформления в тексте: [5], [18, 20, 21].

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 (в конце статьи)

Автоматические переводы не всегда способны точно передать нюансы и смысл оригинала. Чтобы сохранить содержание и тональность текста, может потребоваться использование совершенно других формулировок.

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 рус. 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, в письме необходимо указать вид статьи (экспериментальная, обзорная, краткое сообщение).

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 40

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

Подписано в печать 30.03.2026 г. Формат 60×84¹/₈. Бумага офсетная. Гарнитура Times.
Печать цифровая. Усл. печ. л. 13,49. Уч.-изд. л. 8,75. Тираж 60 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.