

ISSN 1999-9127

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

# **МОЛЕКУЛЯРНАЯ И ПРИКЛАДНАЯ ГЕНЕТИКА**

**СБОРНИК НАУЧНЫХ ТРУДОВ  
ТОМ 23**

Издается с 2005 года  
Выходит два раза в год

Минск  
2017

УДК [577.21 + 575] (082)

**Молекулярная и прикладная генетика:** сб. науч. тр. / Институт генетики и цитологии НАН Беларуси; редколл.: А.В. Кильчевский (гл. ред.) [и др.]. – Минск: Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, 2017. – Т. 23. – 110 с. – ISSN 1999-9127.

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

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

Редакционная коллегия:

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

УДК [577.21 + 575] (082)

ISSN 1999-9127

Институт генетики  
и цитологии НАН Беларуси, 2017

## СОДЕРЖАНИЕ

<i>Н.И. Дубовец, Е.А. Сычева, Н.И. Дробот, Е.Б. Бондаревич, Л.А. Соловей, О.Г.Силкова</i> ДНК-типирование интрогрессивных дисомных линий <i>Triticum aestivum/Secale cereale</i> и анализ эффектов интрогрессии хромосом R-генома на проявление у них хозяйствен- но ценных признаков.....	7
<i>М.Н. Шаптуренко, Т.В. Никитинская, Т.В. Печковская, Л.А. Мишин, А.В. Кильчевский, Л.В. Хотылева</i> Полиморфизм микросателлитных локусов перца сладкого ( <i>Capsicum annuum</i> L.) в свя- зи с реализацией гетеротического потенциала гибридов F <sub>1</sub> .....	15
<i>И.А. Гордей, О.М. Люсигов, И.С. Гордей, В.Е. Шимко, А.В. Вершинин, Е.В. Евтушенко, Ю.А. Липихина</i> Молекулярно-генетические основы создания нового генофонда ржи и ржано-пшенич- ных амфидиплоидов секалотритикум.....	26
<i>Н.И. Дубовец, Е.А. Сычева, Н.И. Дробот, Е.Б. Бондаревич, Л.А. Соловей, С.П. Халецкий</i> Характеристика исходного материала по комплексу признаков для селекции овса по- севного <i>Avena sativa</i> L. методом отдаленной гибридизации .....	40
<i>М.Н. Шаптуренко, Т.В. Печковская, А.В. Якимович, Ю.М. Забара, С.И. Вакула, Л.В. Хотылева</i> Генетическая дивергенция и ее роль в реализации гетеротического потенциала капусты белокочанной ( <i>Brassica oleracea</i> L.) .....	50
<i>А.В. Колубако, Е.А. Николайчик</i> Роль <i>NDR1</i> в реакции растений <i>Nicotiana benthamiana</i> на заражение бактериями <i>Pecto- bacterium carotovorum</i> .....	60
<i>Л.Н. Сивицкая, Т.Г. Вайханская, Н.Г. Даниленко, Т.В. Курушко, О.Г. Давыденко</i> Мутации в гене <i>LMNA</i> , приводящие к конформационным изменениям ламин А/С и развитию дилатационной кардиомиопатии.....	67
<i>Е.Г. Смирнова, В.Н. Кипень, С.Б. Мельнов, А.А. Мохорт</i> Полиморфизм генов глутатион-S-трансфераз при раке почки .....	75
<i>А.Н. Щаюк, М.Н. Шепетько, Е.П. Михаленко, Н.В. Чеботарёва, Э.В. Крупнова</i> Роль генов матриксных металлопротеиназ <i>MMP2</i> и <i>MMP9</i> в развитии и течении не- мелкоклеточного рака легкого .....	83

*И.Н. Ильющёнок, Е.П. Гунько, М.Л. Антонович, Н.Н. Яцков, А.М. Кустанович, А.Ю. Сухаревский, В.В. Скакун, В.В. Гринев*

Изучение закономерностей сплайсинга РНК гибридного онкогена *RUNXI-RUNX1T1* человека с помощью методов интеллектуального анализа данных и высокопроизводительного секвенирования ..... 92

*Ю.А. Моголевцева, А.В. Мезенцев, С.А. Брускин*

Анализ изменений, вызванных РНК-интерференцией ММП1, в эпидермальных кератиноцитах, обработанных интерфероном- $\gamma$  ..... 102

## CONTENTS

<i>N.I. Dubovets, Y.A. Sycheva, N.I. Drobot, Y.B. Bondarevich, L.A. Solovey, O.G. Silkova</i> DNA-typing of introgressive disomic lines <i>Triticum aestivum</i> / <i>Secale cereale</i> and the analysis of effects of R-genome chromosome introgression on the manifestation of their economically useful traits .....	7
<i>M.N. Shapturenko, T.V. Nikitinskaya, T.V. Pechkovskaya, L.A. Mishin, A.V. Kilchevsky, L.V. Khotyleva</i> Polymorphisms of microsatellites loci of a sweet pepper ( <i>Capsicum annuum</i> L.) in relation to F <sub>1</sub> heterotic response .....	15
<i>I.A. Gordei, O.M. Lyusikov, I.S. Gordei, V.E. Shimko, A.V. Vershinin, E.V. Evtushenko, Yu.A. Lipikhina</i> Molecular genetic basis for the development of the new gene pool of rye and wheat-rye amphidiploids of <i>Secalotriticum</i> .....	26
<i>N.I. Dubovets, Y.A. Sycheva, N.I. Drobot, Y.B. Bondarevich, L.A. Solovey, S.P. Khaletsky</i> Characteristic of the initial material by a complex of traits for use in oat ( <i>Avena sativa</i> L.) breeding by the method of distant hybridization .....	40
<i>M.N. Shapturenko, T.V. Pechkovskaya, A.V. Yakimovitch, Y.M. Zabara, S.V. Vakula, L.V. Khotyleva</i> Prognostic potential of SSR markers for F <sub>1</sub> white cabbage ( <i>Brassica oleracea</i> L.) hybrids selection .....	50
<i>A.V. Kolubako, Y.A. Nikolaichik</i> Role of <i>NDR1</i> in the reaction of <i>Nicotiana benthamiana</i> plants to <i>Pectobacterium carotovorum</i> infection .....	60
<i>L.N. Sivitskaya, T.G. Vaikhanskaya, N.G. Danilenko, T.V. Kurushka, O.G. Davydenko</i> Mutations in <i>LMNA</i> gene leading to lamin A/C conformational changes and dilated cardiomyopathy .....	67
<i>E.G. Smirnova, V.N. Kipen, S.B. Melnov, A.A. Mokhort</i> Glutathion-S-transferase gene polymorphism in renal cancer .....	75
<i>A.N. Shchayuk, M.N. Shapetska, A.P. Mikhalenka, N.V. Chebotareva, E.V. Krupnova</i> Role of matrix metalloproteinases' genes <i>MMP2</i> and <i>MMP9</i> in the development and progression of non-small cell lung cancer .....	83

*I.M. Ilyushonak, E.P. Gunko, M.L. Antonovich, M.M. Yatskou, A.M. Kustanovich, A.Y. Sukhareuski, V.V. Skakun, V.V. Grinev*  
Study of RNA splicing patterns of the human *RUNX1-RUNX1T1* fusion oncogene by the methods of data mining and high-throughput DNA sequencing..... 92

*J.A. Mogulevtseva, A.V. Mezentsev, S.A. Bruskin*  
Changes caused by MMP1-silencing in epidermal keratinocytes pretreated with interferon- $\gamma$  and their analysis ..... 102

Н.И. Дубовец<sup>1</sup>, Е.А. Сычева<sup>1</sup>, Н.И. Дробот<sup>1</sup>, Е.Б. Бондаревич<sup>1</sup>, Л.А. Соловей<sup>1</sup>, О.Г.Силкова<sup>2</sup>

## ДНК-ТИПИРОВАНИЕ ИНТРОГРЕССИВНЫХ ДИСОМНЫХ ЛИНИЙ *TRITICUM AESTIVUM/SECALE CEREALE* И АНАЛИЗ ЭФФЕКТОВ ИНТРОГРЕССИИ ХРОСОМОМ R-ГЕНОМА НА ПРОЯВЛЕНИЕ У НИХ ХОЗЯЙСТВЕННО ЦЕННЫХ ПРИЗНАКОВ

<sup>1</sup>Институт генетики и цитологии НАН Беларуси

Республика Беларусь, 220072, г. Минск, ул. Академическая, 27; e-mail: n.i.dubovets@igc.by

<sup>2</sup>ФИЦ «Институт цитологии и генетики Сибирского Отделения РАН»

Россия, 630090, г. Новосибирск, пр. Академика Лаврентьева, 10

Проведено молекулярно-цитогенетическое маркирование (С-бэндинг) интрогрессивных линий пшеницы с различными типами R(A)-, R(B)- и R(D)-замещений хромосом и ДНК-типирование их по генам, ассоциированным с формированием короткостебельности (*Rht-B1*, *Rht-D1*, *Rht8*) и устойчивости к предуборочному прорастанию (*Vp-1B*). Установлено, что исследованные генотипы содержат дикий аллель гена *RhtB1* (*RhtB1a*) и мутантные аллели генов *Rht8* (*Rht8b*) и *Vp-1B* (*Vp-1Bc*) в гомозиготном состоянии, а также в подавляющем большинстве являются гетерозиготными по аллельному составу гена *Rht-D1* (*Rht-D1a/Rht-D1b*). В ходе исследования эффектов интрогрессии хромосом ржи на устойчивость пшеницы к предуборочному прорастанию зерна подтверждено негативное влияние на признак хромосомы 2R. В то же время показано, что степень проявления негативного эффекта у линий с разным пшеничным бэкграундом различна и, следовательно, определяется комбинацией аллельных вариантов генов устойчивости и специфических локусов количественных признаков (*QPhsR*), присутствующих в конкретном генотипе. В целом не выявлено негативного влияния интрогрессии пары хромосом ржи в геном пшеницы путем замещения ими соответствующих гомеологов А-, В- и D-геномов на формирование признака «высота растения».

**Ключевые слова:** пшенично-ржаные гибриды, интрогрессивные линии *Triticum aestivum/Secale cereale*, кариотип, С-бэндинг, ДНК-маркеры, короткостебельность, устойчивость к предуборочному прорастанию.

### Введение

Селекционные программы по пшенице неизменно сталкиваются с задачей увеличения генетического разнообразия и его эффективного использования для нужд сельского хозяйства. Одним из основных методов расширения генетической изменчивости *Triticum aestivum* L. является отдаленная гибридизация с видами и родами трибы *Triticeae*, позволяющая наиболее эффективно обогащать генофонд культуры. В частности, широкое применение в программах по селекции пшеницы нашла гибридизация с рожью (*Secale cereale* L.). На сегодняшний день накоплен большой опыт создания и изучения интрогрессивных пшенично-ржаных форм с разнообразным геномным составом [1–5], тем не менее, ни научный, ни селекционный потенциал данного направления далеко не исчерпан.

В статье представлены результаты генотипирования интрогрессивных дисомных линий *Triticum aestivum/Secale cereale* с помощью ДНК-маркеров, а также изучения эффектов интрогрессии хромосом R-генома в кариотип мягкой пшеницы на проявление ряда важных с селекционной точки зрения признаков.

### Материалы и методы

Объектами исследования служили 7 интрогрессивных линий пшеницы с различными типами R(A)-, R(B)- и R(D)-замещений хромосом. Линии были созданы в Институте цитологии и генетики СО РАН путем гибридизации мягкой пшеницы сорта Саратовская 29 с диплоидной рожью сорта Онохойская (за исключением линии 1R<sub>v</sub>(1A), созданной при участии сорта Вятка) с последующим беккроссированием полученных полигаплоидов (ABDR) исходным сортом пшеницы (линии

1R<sub>v</sub>(1A), 1R<sub>on</sub>(1A), 3R(3B), 5R(5D)) и сортом Новосибирская 67 (линии 2R(2D), 2R(2D)<sub>2</sub> и 2R(2D)<sub>3</sub>) [6]. Экспериментальный материал выращивался на опытном поле Института генетики и цитологии НАН Беларуси.

Для анализа геномной структуры экспериментального материала был использован вариант метода дифференциального окрашивания хромосом по Гимза (С-бэндинг) [7]. Идентификация индивидуальных хромосом А-, В-, D- и R-геномов проводилась согласно обобщенной видовой идиограмме дифференциально окрашенных хромосом [8]. Выделение и очистку ДНК осуществляли с помощью готовых наборов реактивов Genomic DNA Purification Kit K0512 (Fermentas, Литва). Для выявления аллельного состава генов короткостебельности *Rht-B1b*, *Rht-D1* и *Rht8* использовались праймеры в модификации X. Zhang et al. [9]. Для определения аллельного состава гена *Viviparous-1B* использовали STS-маркер Vp1B3, разработанный Y. Yang et al. [10]. Продукты ПЦР фракционировали методом горизонтального электрофореза в 1,5%-ном агарозном геле в 1×TAE буфере в течение 45–60 минут при напряжении в 80–100 В. Результаты документировались в системе гель-документации QUANTUM ST4-1100. Для точного определения размера амплифицированных фрагментов с SSR-маркерами был проведен фрагментный анализ продуктов ПЦР. Данные анализировались в программной среде, поставляемой с прибором Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer.

Для оценки проявления у пшенично-ржаных гибридов признака «устойчивость к предуборочному прорастанию» был проведен лабораторный тест с использованием показателя «процент проросших зерен» (ППЗ) при проращивании свежесобранного зерна в чашках Петри в течение 24 и 48 часов [11]. Процент проросших зерен через 24 часа отражает стартовую способность к прорастанию самого зерна, а через 48 часов определяется генотипическими различиями по прорастанию зерна. Для проведения эксперимента было отобрано по 100 зерен каждого образца в двух повторностях, которые проращивались в термостате при температуре 26 °С.

### Результаты и обсуждение

Принимая во внимание сложную геномную структуру интрогрессивных линий пшеницы, а также необходимость получения точной информации о хромосомном составе образцов для оценки эффектов интрогрессии чужеродных хромосом и целенаправленного использования ПЦР-маркеров при идентификации аллельного состояния генов, все задействованные в эксперименте линии были предварительно кариотипированы с использованием метода С-бэндинга. Результаты проведенного анализа подтвердили данные, полученные на материале более ранних этапов его репродукции [6], о наличии у линий соответствующих R(A)-, R(B)- и R(D)-замещений хромосом (рис. 1), что свидетельствует о высокой цитологической стабильности созданных в ИЦиГ СО РАН линий.

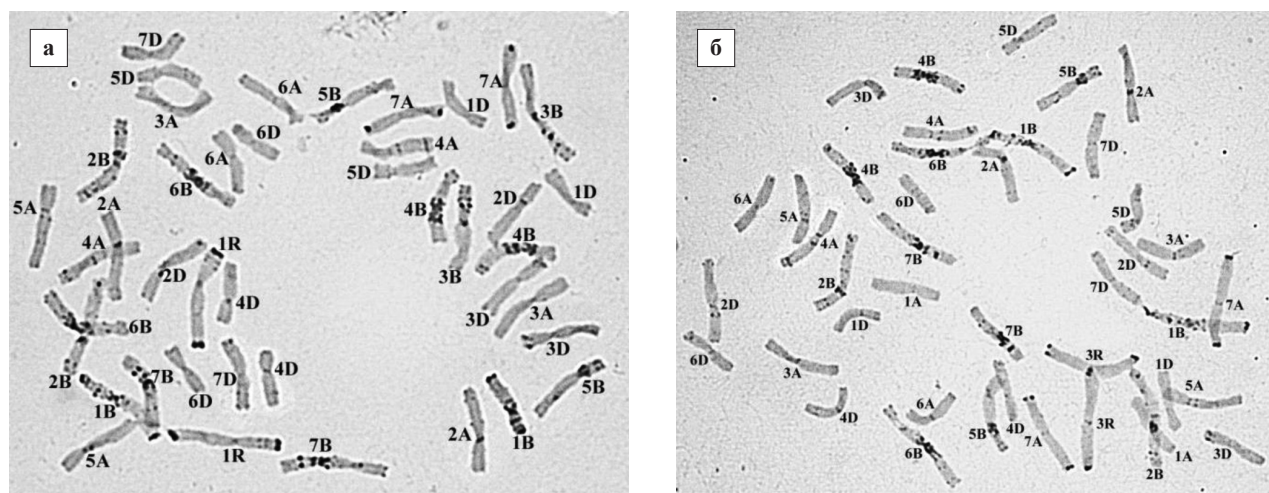


Рис. 1. Кариотипы интрогрессивных дисомных линий *Triticum aestivum/Secale cereale* с межгеномными замещениями хромосом: а – 1R(1A); б – 3R(3B)



Внедрение созданных интрогрессивных форм пшеницы в селекционный процесс предполагает, что помимо цитологической стабильности, обеспечивающей сохранение в геноме чужеродного генетического материала с целевыми генами, эти формы должны обладать комплексом хозяйственно ценных признаков. Исходя из этого, с помощью ДНК-маркеров изучен аллельный состав генов, ассоциированных с формированием короткостебельности (*Rht-B1*, *Rht-D1*, *Rht8*) и устойчивости к предуборочному прорастанию (*Vp-1B*), а также оценены эффекты интрогрессии хромосом R-генома в кариотип мягкой пшеницы *Triticum aestivum* на проявление данных селекционно важных признаков.

Из всех известных на данный момент генов короткостебельности *Triticum aestivum* наибольшее применение в селекционных программах нашли три – *Rht-B1*, *Rht-D1* и *Rht8*. Известно, что ген *Rht-B1* локализован в коротком плече хромосомы 4В и имеет семь аллелей (*b*, *c*, *d*, *e*, *f*, *g*, *Rht-B1*<sup>IC2196</sup>), образовавшихся в результате различных мутаций [12–15]. Интерес для селекции представляют аллели *Rht-B1b* и *Rht-B1e*, присутствие которых приводит к существенному снижению высоты растений.

Согласно данным кариотипирования, хромосома 4В присутствует в геноме всех включенных в эксперимент линий. В ходе молекулярно-генетического анализа аллельного

состояния гена *Rht-B1* установлено, что все линии являются гомозиготными по дикому аллелю *Rht-B1a* (табл. 1, рис. 2).

Для гена *Rht-D1*, локализованного на хромосоме 4D, выявлены 4 аллеля (*a*, *b*, *d* и *c*) [14], при этом дикий аллель гена *Rht-D1a* не влияет на длину соломины, тогда как мутантные аллели короткостебельности *Rht-D1b* и *Rht-D1c* снижают высоту растений пшеницы до 25% и ≈50%, соответственно [16, 17].

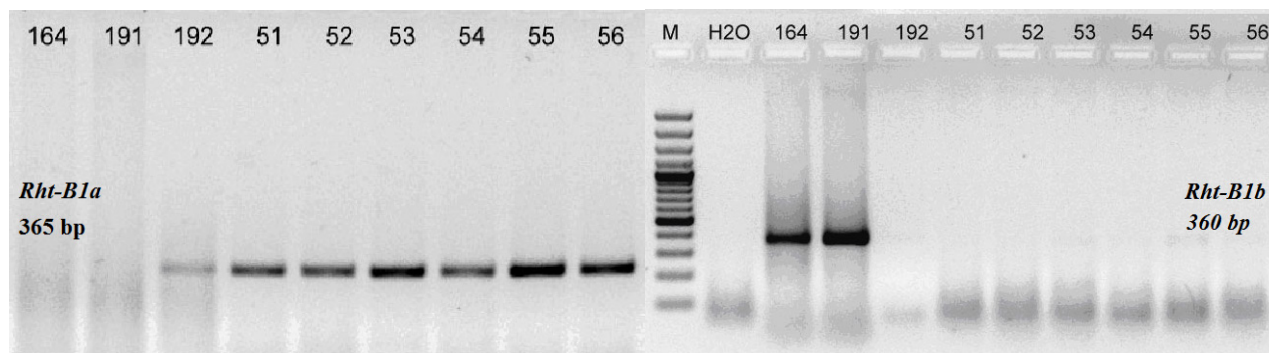
Проведенный нами молекулярно-генетический анализ (табл. 1) показал, что у исходного сорта мягкой пшеницы Саратовская 29 подавляющее большинство растений (9 из 10 проанализированных) являются гетерозиготными по аллельному составу гена *Rht-D1* и содержат как дикий *Rht-D1a*, так и мутантный *Rht-D1b* аллели. Одно растение было гомозиготным по дикому аллелю. Все растения интрогрессивных линий 1R<sub>v</sub>(1A), 2R(2D)<sub>2</sub>, 2R(2D)<sub>3</sub>, 3R(3B) и 5R(5A) были гетерозиготными по аллельному составу гена *Rht-D1*. У линии 1R<sub>on</sub>(1A) одно растение из десяти проанализированных было гомозиготным по дикому аллелю *Rht-D1a*, а у линии 2R(2D) отмечено одно растение, гомозиготное по мутантному аллелю *Rht-D1b*, в то время как остальные растения содержали гетерозиготу *Rht-D1a/Rht-D1b*.

Для изучения аллельного состояния гена *Rht8*, локализованного на хромосоме 2DS, использовали сцепленный с ним микроса-

Таблица 1

Результаты анализа аллельного состава генов короткостебельности и признака «высота растения» у сорта пшеницы Саратовская 29 и созданных на её основе пшенично-ржаных интрогрессивных линий

Генотип	Аллельный состав генов короткостебельности			Высота растений, см
	<i>Rht-B1</i>	<i>Rht-D1</i>	<i>Rht8</i>	
Саратовская 29	<i>Rht-B1a</i>	<i>Rht-D1a/Rht-D1b</i> , <i>Rht-D1a</i>	<i>Rht8b</i>	63,36 ± 1,49
1R <sub>v</sub> (1A)	<i>Rht-B1a</i>	<i>Rht-D1a/Rht-D1b</i>	<i>Rht8b</i>	64,88 ± 1,47
1R <sub>on</sub> (1A)	<i>Rht-B1a</i>	<i>Rht-D1a/Rht-D1b</i> , <i>Rht-D1a</i>	<i>Rht8b</i>	66,25 ± 1,20
2R(2D)	<i>Rht-B1a</i>	<i>Rht-D1a/Rht-D1b</i> , <i>Rht-D1b</i>	–	61,71 ± 1,11
2R(2D) <sub>2</sub>	<i>Rht-B1a</i>	<i>Rht-D1a/Rht-D1b</i>	–	63,86 ± 1,25
2R(2D) <sub>3</sub>	<i>Rht-B1a</i>	<i>Rht-D1a/Rht-D1b</i>	–	64,79 ± 1,31
3R(3B)	<i>Rht-B1a</i>	<i>Rht-D1a/Rht-D1b</i>	<i>Rht8b</i>	62,50 ± 1,62
5R(5D)	<i>Rht-B1a</i>	<i>Rht-D1a/Rht-D1b</i>	<i>Rht8b</i>	61,50 ± 1,97



**Рис. 2.** Электрофореграмма детекции аллелей *Rht-B1a* и *Rht-B1b* у пшенично-ржаной интрогрессивной линии 1R<sub>v</sub>(1A).

Дорожки 164, 191 – положительный контроль на аллель *Rht-B1b* (сорт тритикале Kargo); 192 – положительный контроль на аллель *Rht-B1a*; 51–56 – интрогрессивная линия 1R<sub>v</sub>(1A); М – маркер молекулярного веса Gene-Ruler™ 100 bp DNA Ladder

теллитный локус *Xgwm261*. Всего выявлено 20 аллелей данного локуса, но наиболее распространенными являются аллели 165, 174 и 192 п.н. На пшенице показано, что дикий аллель гена *Rht8a* (*Xgwm261*<sub>165</sub>) не влияет на высоту растений, тогда как аллель *Rht8c* (*Xgwm261*<sub>192</sub>) снижает высоту примерно на 8 см [17].

Аллельный состав гена *Rht8* был изучен у 4 линий (за исключением линий с 2R(2D)-замещениями). В ходе фрагментного анализа полученных продуктов ПЦР было установлено, что все исследованные линии несут аллель *Rht8b* (174 п.н.). Коммерческий аллель *Rht8c* данного гена, обуславливающий существенное снижение высоты растения, в исследованном материале не выявлен.

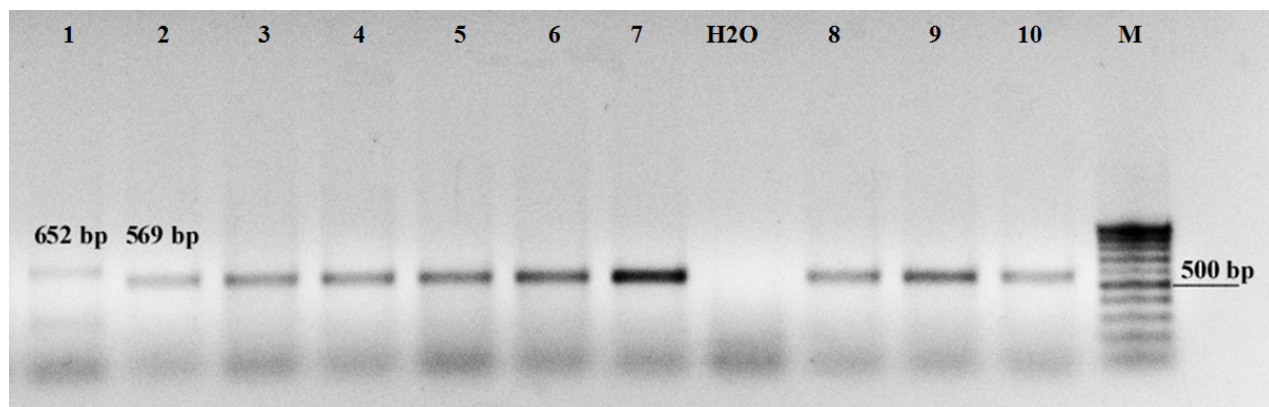
Из представленных в табл. 1 результатов морфометрического анализа видно, что интрогрессия пары хромосом ржи в геном пшеницы путем замещения ими соответствующих гомеологов А-, В- и D-геномов не оказала существенного влияния на высоту растений – различия между исходным сортом и линиями не превышают 2 см как в сторону увеличения, так и в сторону уменьшения признака. Наименьшее значение признака отмечено у линии 5R(5D), а наибольшее – у линии 1R<sub>on</sub>(1A). При этом разница в значении признака между данными линиями составляет всего 4,75 см.

Устойчивость к предуборочному прорастанию зерна – один из важнейших приоритетов в селекции пшеницы. В ходе исследования этого признака у интрогрессивных линий пшеницы изучен аллельный состав гена *Vp-1B*

(*Viviparous-1B*), локализованного в длинном плече хромосомы 3В и идентифицированного в качестве основного гена, детерминирующего покой семян [18–21]. Установлено, что все включенные в эксперимент линии (за исключением 3R(3В), у которой отсутствует хромосома 3В), так же, как и сорт Саратовская 29, содержат аллель *Vp-1Bc*, ассоциированный с устойчивостью к предуборочному прорастанию зерна (рис. 3).

В то же время данные лабораторного экспресс-теста, базирующегося на анализе процента проросших зерен (ППЗ) при проращивании свежееубранного зерна в течение 24 и 48 часов, показали существенное варьирование по исследованному показателю (от 2% до 36%) (табл. 2). Линии 3R(3В) и 5R(5D) продемонстрировали высокую устойчивость к предуборочному прорастанию, тогда как 1R<sub>v</sub>(1A) и 2R(2D) характеризовались наибольшим процентом проросших зерен в обеих повторностях. Для остальных линий выявлена умеренная устойчивость, сравнимая с таковой у исходного сорта Саратовская 29. Из этого следует, что различные типы межгеномных замещений оказывают разный эффект на устойчивость к прорастанию зерна в колосе.

Ранее К. Рыбка [22] с использованием D(R)-замещенных форм тритикале было выполнено исследование влияния генома ржи на устойчивость тритикале к предуборочному прорастанию. По данным автора, все линии, кроме линии с 6D(6R)-замещением, продемонстрировали более высокую устойчивость, чем сорт тритикале Presto, на основании чего был



**Рис. 3.** Электрофореграмма детекции аллелей гена *Vp1B*: аллель *Vp1Bc* у интрогрессивных линий 1R<sub>v</sub>(1A) (дорожки 2–4), 2R(2D) (5–7), 2R(2D)<sub>2</sub> (8–10). М – маркер молекулярного веса GeneRuler™ 100 bpDNA Ladder; дорожка 1 – сорт тритикале Гренадо, положительный контроль на аллель *Vp1Ba*

сделан вывод о негативном влиянии хромосом ржи на устойчивость к предуборочному прорастанию тритикале. При этом наиболее резистентной оказалась линия с 2D(2R)-замещением хромосом. В нашем же материале линия с 2R(2D)-замещением хромосом, наоборот, характеризуется наименьшей устойчивостью. Это, с одной стороны, подтверждает негативный эффект на устойчивость к предуборочному прорастанию хромосомы 2R, а с другой стороны, может свидетельствовать в пользу данных X.B. Ren et al. [23], картировавших QTL устойчивости к предуборочному прорастанию на коротком плече хромосомы 2D. Нельзя, однако, не отметить, что две другие линии с аналогичным меж-

геномным замещением, но различающиеся по пшеничному бэкграунду, по значению ППЗ находятся на уровне исходного сорта пшеницы. Из этого следует, что степень проявления негативного эффекта хромосомы 2R на устойчивость пшенично-ржаной замещенной линии к предуборочному прорастанию в значительной степени определяется комбинацией аллельных вариантов генов устойчивости и специфических локусов количественных признаков (*QPhsR* – Quantitative Preharvest sprouting Resistance), присутствующих в геноме данной линии.

В то же время сопоставление полученных данных для линий с одинаковым межгеномным замещением 1R(1A), но различающихся

**Таблица 2**

Результаты оценки устойчивости сорта пшеницы Саратовская 29 и созданных на её основе интрогрессивных линий к предуборочному прорастанию зерна

Генотип	Процент проросших зерен, % (1-я повторность)		Процент проросших зерен, % (2-я повторность)	
	24 ч	48 ч	24 ч	48 ч
Саратовская 29	3	23	4	18
1R <sub>v</sub> (1A)	3	33	3	36
1R <sub>оп</sub> (1A)	2	16	1	14
2R(2D)	6	37	8	36
2R(2D) <sub>2</sub>	4	20	5	19
2R(2D) <sub>3</sub>	1	22	4	20
3R(3B)	3	7	2	9
5R(5D)	1	3	2	2

по сортовой принадлежности хромосомы 1R (табл. 2), свидетельствует о том, что на исследуемый признак оказывает влияние не только пшеничный бэкграунд, но и генотип ржи.

В целом, наибольшую устойчивость к предуборочному прорастанию зерна проявили линии с 5R(5D)- и 3R(3B)-замещениями хромосом.

### Заключение

Проведено молекулярно-цитогенетическое маркирование (С-бэндинг) интрогрессивных линий пшеницы с различными типами R(A)-, R(B)- и R(D)-замещений хромосом и ДНК-типирование их по генам, ассоциированным с формированием короткостебельности (*Rht-B1*, *Rht-D1*, *Rht8*) и устойчивости к предуборочному прорастанию (*Vp-1B*). Установлено, что исследованные генотипы содержат дикий аллель гена *RhtB1* (*RhtB1a*) и мутантные аллели генов *Rht8* (*Rht8b*) и *Vp-1B* (*Vp-1Bc*) в гомозиготном состоянии, а также в подавляющем большинстве являются гетерозиготными по аллельному составу гена *Rht-D1* (*Rht-D1a/Rht-D1b*). В ходе исследования эффектов интрогрессии хромосом ржи на устойчивость пшеницы к предуборочному прорастанию зерна подтверждено негативное влияние на признак хромосомы 2R. В то же время показано, что степень проявления негативного эффекта у линий с разным пшеничным бэкграундом различна и, следовательно, определяется комбинацией аллельных вариантов генов устойчивости и специфических локусов количественных признаков (*QPhsR*), присутствующих в конкретном генотипе. В целом не выявлено негативного влияния интрогрессии пары хромосом ржи в геном пшеницы путем замещения ими соответствующих гомеологов А-, В- и D-геномов на формирование признака «высота растения».

Работа выполнена при финансовой поддержке грантов РФФ № 16-16-00011 и БРФФИ № Б15СО-030.

### Список использованных источников

1. Shlegel, R.: Current list of wheats with rye and alien introgression [Electronic resource]. – Mode of access: <http://www.rye-gene-map.de/rye-introgression/>.

2. Molecular cytogenetic characterization of a new wheat-rye 4R chromosome translocation line resistant to powdery mildew / D. An [et al.] // *Chromosome Res.* – 2013. – Vol. 21. – P. 419–432.

3. Molecular cytogenetic identification of a new wheat-rye 6R chromosome disomic addition line with powdery mildew resistance / D. An [et al.] // *PLoS ONE.* – Vol. 10(8). – doi: e0134534. doi:10.1371/journal.pone.0134534, 2015.

4. New wheat-rye 5DS-4RS4RL and 4RS-5DS5DL translocation lines with powdery mildew resistance / S. Fu [et al.] // *J. Plant Res.* – 2014. – Vol. 127(6). – P. 743–753.

5. Crespo-Herrera, L.A. A systematic review of rye (*Secale cereale* L.) as a source of resistance to pathogens and pests in wheat (*Triticum aestivum* L.) / L.A. Crespo-Herrera, L. Garkava-Gustavsson, I. Ahman // *Hereditas.* – 2017. – Vol. 154. – P. 14.

6. Создание пшенично-ржаных замещенных линий с идентификацией хромосомного состава кариотипов методами С-бэндинга, GISH и SSR-маркеров / О.Г. Силкова [и др.] // *Генетика.* – 2006. – Т. 42, № 6. – С. 1–9.

7. Бадаева, Е.Д. Изменение хромосом ржи в кариотипе тритикале: дис. ... канд. биол. наук: 03.00.15 / Е.Д. Бадаева. – М., 1984. – 181 л.

8. Badaeva, E.D. “Chromosomal passport” of *Triticum aestivum* L. em Thell. cv. Chinese Spring and standartization of chromosomal analysis of cereals // *Cereal Res. Commun.* – 1990. – Vol. 18, № 4. – P. 273–281.

9. Distribution of the *Rht-B1b*, *Rht-D1* and *Rht8* reduced height genes in autumn-sown Chinese wheats detected by molecular markers / X. Zhang [et al.] // *Euphytica.* – 2006. – Vol. 152, № 1. – P. 109–116.

10. Development and validation of a Viviparous-1 STS marker for pre-harvest sprouting tolerance in Chinese wheats / Y. Yang [et al.] // *Theor Appl Genet.* – 2007. – Vol. 115(7). – P. 971–980.

11. Нгуен, Т.Т.Л. Разработка системы оценок устойчивости к прорастанию на корню озимой тритикале: автореф. дис. ... канд. с.-х. наук: 06.01.05 / Т.Т.Л. Нгуен. – М., 2011. – 22 с.

12. Borner, A. The relationships between the dwarfing genes of wheat and rye / A. Borner [et al.] // *Euphytica.* – 1996. – Vol. 89. – P. 69–75.

13. 'Green Revolution' Genes Encode Mutant Gibberellin Response Modulators / J.R. Peng // *Nature*. – 1999. – Vol. 400. – P. 256–261.
14. Pearce, S. Molecular Characterization of *Rht1* Dwarfing Genes in Hexaploid Wheat / S. Pearce, R. Saville, S.P. Vaughan // *Plant Physiology*. – 2011. – Vol. 157. – P. 1820–1831.
15. Isolation of a gibberellin-insensitive dwarfing gene, *Rht-1Ble*, and development of an allele-specific PCR marker / A. Li // *Molecular Breeding*. – 2012. – Vol. 30. – P. 1443–1451.
16. Optimizing wheat grain yield effects of *Rht* (gibberellin-insensitive) dwarfing genes / E. Flintham [et al.] // *The Journal of Agricultural Science, Cambridge*. – 1997. – Vol. 128. – P. 11–25.
17. Hoogendoorn, J. Differences in Leaf and Stem Anatomy Related to Plant Height of Tall and Dwarf Wheat (*Triticum aestivum* L.) / J. Hoogendoorn, J.M. Rickson, M.D. Gale // *Journal of Plant Physiology*. – 1990. – Vol. 136. – P. 72–77.
18. Identifying alleles of *Viviparous-1B* associated with pre-harvest sprouting in micro-core collections of Chinese wheat germplasm / P. Chang [et al.] // *Mol. Breeding*. – 2010. – Vol. 25. – P. 481–490.
19. The association between the allelic state of *Vp-1B* and pre-harvest sprouting tolerance in red-seeded hexaploid triticale / M. Divashuk [et al.] // *Open J. Genet.* – 2012. – Vol. 2, № 1. – P. 51–55.
20. Development and validation of a *Viviparous-1* STS marker for pre-harvest sprouting tolerance in Chinese wheats / Y. Yang [et al.] // *Theor. Appl. Genet.* – 2007. – Vol. 115. – P. 971–980.
21. Nakamura, S. Isolation of a VP1 homologue from wheat and analysis of its expression in embryos of dormant and non-dormant cultivars / S. Nakamura, T. Toyama // *J. Exp. Bot.* – 2001. – Vol. 52. – P. 875–876.
22. Rybka, K. An approach to identification of rye chromosomes affecting the pre-harvest sprouting in triticale / K. Rybka // *J. Appl. Genet.* – 2003. – Vol. 44, № 4. – P. 491–496.
23. Mapping QTLs for pre-harvest sprouting tolerance on chromosome 2D in a synthetic hexaploid wheat×common wheat cross / X.B. Ren [et al.] // *J. Appl. Genet.* – 2008. – Vol. 49. – P. 333–341.

N.I. Dubovets<sup>1</sup>, Y.A. Sycheva<sup>1</sup>, N.I. Drobot<sup>1</sup>, Y.B. Bondarevich<sup>1</sup>, L.A. Solovey<sup>1</sup>, O.G. Silkova<sup>2</sup>

## DNA-TYPING OF INTROGRESSIVE DISOMIC LINES *TRITICUM AESTIVUM/SECALE CEREALE* AND THE ANALYSIS OF EFFECTS OF R-GENOME CHROMOSOME INTROGRESSION ON THE MANIFESTATION OF THEIR ECONOMICALLY USEFUL TRAITS

<sup>1</sup>Institute of Genetics and Cytology, NAS of Belarus

Minsk BY-220072, the Republic of Belarus

<sup>2</sup>Institute of Cytology and Genetics SB RAS

Novosibirsk, 630090, Russia

Molecular cytogenetic marking (C-banding) of introgressive wheat lines with various types of R(A)-, R(B)- and R(D)-chromosome substitutions and their DNA-typing by genes associated with a decrease in plant height (*Rht- B1*, *Rht-D1*, *Rht8*) and pre-harvest sprouting resistance (*Vp-1B*) was carried out. It was shown that the studied genotypes contain a wild allele of the *RhtB1* (*RhtB1a*) gene and the mutant alleles of *Rht8* (*Rht8b*) and *Vp-1B* (*Vp-1Bc*) genes in the homozygous state and in the overwhelming majority are heterozygous by allelic composition of the *Rht-D1* (*Rht-D1a/Rht-D1b*) gene. A negative effect of the chromosome 2R on trait was proved as a result of introgression effects' study of rye chromosomes on the resistance of wheat to pre-harvest grain germination. At the same time, it was shown that a degree of negative effect manifestation in lines with different wheat backgrounds varies and, consequently, is determined by the combination of allelic variants of resistance genes and specific loci of quantitative characters (*QPhsR*) in a particular genotype. In general, no negative effect of the rye chromosome introgression into the wheat genome by the means of substitution of corresponding A-, B- or D-genomes homeologs on the "plant height" character formation was identified.

**Key words:** wheat-rye hybrids, introgressive wheat lines *Triticum aestivum/Secale cereale*, semi-dwarfing alleles, karyotype, C-banding, DNA-markers, pre-harvest sprouting resistance.

*Дата поступления статьи: 14 сентября 2017 г.*

М.Н. Шаптуренко<sup>1</sup>, Т.В. Никитинская<sup>1</sup>, Т.В. Печковская<sup>1</sup>, Л.А. Мишин<sup>2</sup>, А.В. Кильчевский<sup>1</sup>,  
Л.В. Хотылева<sup>1</sup>

## ПОЛИМОРФИЗМ МИКРОСАТЕЛЛИТНЫХ ЛОКУСОВ ПЕРЦА СЛАДКОГО (*CAPSICUM ANNUUM* L.) В СВЯЗИ С РЕАЛИЗАЦИЕЙ ГЕТЕРОТИЧЕСКОГО ПОТЕНЦИАЛА ГИБРИДОВ F<sub>1</sub>

<sup>1</sup>Институт генетики и цитологии НАН Беларуси  
Республика Беларусь, 220072, г. Минск, ул. Академическая, 27  
e-mail: m.shapturenko@igc.by

<sup>2</sup>РУП «Институт овощеводства»  
Республика Беларусь, 223013, Минский р-н, п. Самохваловичи, ул. Ковалева, 2

Изучены перспективы использования SSR-маркеров для предсказания генетического потенциала гибридов F<sub>1</sub> перца сладкого. Показано, что оценка SSR-полиморфизма может быть полезна, однако имеет ограничения, так как только часть гетерозиготного преимущества F<sub>1</sub> может быть объяснена уровнем генетической дивергенции (GD) их родителей. Для понимания генетических основ гетерозиса и его эффективного практического использования необходимо детализировать оценку GD для выбора «позитивных» маркеров, т.е. обеспечивающих выявление той части гетерогенности, которая связана с экспрессией гетерозиса в F<sub>1</sub>.

**Ключевые слова:** гетерозис, SSR-полиморфизм, перец сладкий.

### Введение

Гетерозис как феномен превосходства гибридов F<sub>1</sub> над родителями является основным механизмом повышения продуктивности в сельскохозяйственном производстве, но при этом остается одним из наиболее интригующих явлений с точки зрения генетики. Первые попытки выяснения его генетических основ базировались на использовании теоретических моделей, которые хоть и оказались полезными, но не смогли в полной мере охарактеризовать это уникальное явление [1].

Классические теории рассматривают гетерозиготность гибридов F<sub>1</sub> как основной фактор, обуславливающий гетерозис и, в связи с этим, предполагают существование линейной зависимости между генетическими дистанциями (GD, genetic distance) исходных родительских форм и гетеротическим ответом F<sub>1</sub> [2]. Основываясь на этом допущении, предприняты попытки поиска прогностического критерия отбора, который мог бы обеспечить применение полученной о геноме информации в селекционном процессе [3–5]. Наиболее распространенным является использование молекулярного маркирования для установления генетических расстояний GD между ком-

понентами гибридизации (т.е. родительскими линиями) и изучения связи GD с величиной гетерозиса в F<sub>1</sub>. В результате таких исследований были предложены некоторые методические подходы для предсказания гетерозисного преимущества F<sub>1</sub> и создания гетеротических групп [6–8]. Однако полученные результаты оказались противоречивыми [9]. С одной стороны, на точность предсказания может влиять генетическая структура экспериментального материала и тип маркерной системы [10, 11], с другой стороны, важным фактором искажения оценки являются взаимодействия генотип–среда [12]. Y.-I. Cho et al. [13] показали, что прогностическая модель может быть улучшена за счет селективного комбинирования аллелей. Авторы предложили стратегию создания ключевых маркеров, основанную на отборе «позитивных», «нейтральных» и «негативных» для гетерозисной селекции аллелей. Многообещающими оказались выводы J. Crossa et al. [14], основанные на результатах обширных исследований кукурузы и пшеницы, которые свидетельствуют о том, что модели, использующие информацию DAT (Diversity Array Technology) и SNP (single-nucleotide polymorphisms), имеют высокую прогностическую ценность.

В данном исследовании проведен сравнительный анализ перспектив использования оценки дифференциального полиморфизма микросателлитных локусов ДНК для отбора перспективных пар скрещивания в селекции перца сладкого на гетерозис.

### Материалы и методы

Исследовали две группы линий перца сладкого (красноплодные конические, желтоплодные), участвующие в селекционной программе Института овощеводства, направленной на увеличение признаков «длина плода» и «масса плодов с растения». Каждая группа представлена фенотипически сходными образцами, но различающимися по своему эколого-географическому происхождению: красноплодные – L2889 (Здоровье), L2890 (Вечер), L2891 (Дружок), L2892 (Индало×Блонди), L2893 (Добрыня×Фехерозон); желтоплодные – L3163 (Афродита), L3164 (Оранже ГМ), L3165 (№027 ЛИ), L3166 (Квадрат), L3167 (Этюд), L3168 (Оранже КМ).

Гибридизацию линий выполняли вручную по схемам полного диаллельного скрещивания 5×5 и 6×6. Испытания гибридов F<sub>1</sub> осуществляли в остекленных необогреваемых теплицах в четырехкратной повторности при рандомизированном размещении.

ДНК выделяли из этиолированных проростков в трехкратной повторности при помощи набора реагентов Genomic DNA Purification Kit (#K0512, Fermentas) согласно инструкции. Каждая повторность представлена материалом, полученным из 3–9 индивидуальных растений. Препараты ДНК разводили до конечной концентрации 10 ng/ml<sup>-1</sup> в деионизированной воде и хранили при температуре +4 °C.

Для оценки аллельного состава микросателлитных локусов использовали маркеры, разработанные на основе экспрессирующихся последовательностей (EST) [15–17]. Амплификацию проводили на оборудовании Biometra (Германия) в стандартном режиме.

Анализ флуоресцентно-меченых SSR-фрагментов выполнен на автоматическом секвенаторе Applied Biosystems Genetic Analyzer 3500 (США). Размер продуктов амплификации определяли с применением стандарта молекулярного веса S450 (Синтол, РФ). Полученные данные анализировали при помощи пакета прикладных программ GeneMapper 4.1.

Оценку аллельного состава SSR-локусов осуществляли на основе бинарных матриц. Расчет генетических расстояний и кластеризацию экспериментального материала методом UPGMA выполняли с использованием программы DarWin 5.0 (v. 1.3b).

### Результаты и обсуждение

*Микросателлитный анализ полиморфизма перца сладкого*

В результате оценки аллельного состава SSR-локусов рассмотрели 58 аллелей, из которых 54 были полиморфными, включая 10 редких (с частотой встречаемости меньше 0,18) и 9 уникальных. В среднем приходилось 4,9 аллелей на маркер, с варьированием в диапазоне 2–7 на локус, что в 1,5 раза ниже от теоретически ожидаемого по литературным данным (табл. 1). Так, число аллелей было несколько меньшим для маркеров Hpms1-5, Hpms1-143, Hpms1-111, Hpms2-21, Hpms1-168, Hpms1-172, Hpms2-13, Hpms1-1, тогда как для маркеров CAMS-864, CAMS-236, CAMS-647 и CAMS-811 соответствовало ожидаемому. Выявлены аллели, характерные только для красноплодных, а также только для желтоплодных форм. У желтоплодных форм в геномном составе встречаются варианты Hpms2-13 171, 239, 255; Hpms1-5 320; тогда как красноплодные конические линии характеризуются наличием Hpms1-5 318 и 435.

Для оценки уровня полиморфизма каждого маркера применительно к сортам и линиям перца сладкого использовали коэффициент полиморфизма PIC (polymorphic information content). Значение PIC для образцов перца сладкого варьировало от 0,29 для маркера CAMS-647 до 0,91 для HPMS1-172. Среднее значение PIC соответствовало 0,64 что согласуется с данными, представленными в литературе при использовании соответствующих маркеров. В целом, использование SSR-маркеров было эффективным для каждой группы линий. Независимо от объема и состава выборок, все генотипы были дифференцированы. Наибольшее число редких и уникальных аллелей обнаружено у образца L2890 (7 аллелей). У генотипов L3164, L3166 и L3167 уникальных аллелей по анализируемым праймерам выявлено не было, для них определены лишь специфичные сочетания SSR-локусов.



Таблица 1

Характеристика набора микросателлитных (SSR) маркеров, использованных для анализа аллельного состава генотипов перца сладкого (*Capsicum annuum* L.)

Маркер	Фланкируемый микросателлитный мотив	Группа сцепления	Размер выявленных аллелей, п.н.	Число аллелей ожидаемое/ фактическое	PIC
Hpms1-5	(at) <sub>11</sub> (gt) <sub>17</sub>	VI	318, 320, 322, 324	8/4	0,75
Hpms1-143	(ag) <sub>12</sub>	–	217, 219, 221, 223, 225, 230	7/6	0,71
Hpms1-111	(aat) <sub>11</sub>	–	142, 149, 153, 156, 158, 161	11/6	0,69
Hpms2-21	(at) <sub>11</sub> (ac) <sub>9</sub>	X	283, 287, 292, 294, 296, 298	7/6	0,50
CAMS-864	(aga) <sub>32</sub>	VII	203, 212, 215, 221, 227, 230, 233	7/7	0,82
Hpms1-168	(ta) <sub>17</sub> (ga) <sub>12</sub>	XVI	157, 169, 174, 176, 182, 188	9/6	0,61
CAMS-236	(ac) <sub>14</sub> a(ta) <sub>10</sub>	II	154, 167, 188, 190, 205	5/6	0,31
CAMS-647	(tat) <sub>6</sub> tg(tta) <sub>3</sub> ...(tat) <sub>21</sub>	III	217, 229, 232	3/3	0,29
CAMS-811	(aag) <sub>3</sub> ...(gaa) <sub>3</sub> ...(gaa) <sub>7</sub>	IX	232, 240, 250, 324, 327, 330	6/6	0,64
Hpms1-172	(ga) <sub>15</sub>	XI	280, 296, 391, 397	9/4	0,91
Hpms2-13	(ac) <sub>12</sub> (at) <sub>4</sub>	I	247, 255	8/2	0,81
Hpms1-1	(ca) <sub>12</sub> (ta) <sub>4</sub>	I	174, 186, 193, 255	10/4	0,72

По результатам анализа аллельного состава SSR-локусов перца сладкого оценен уровень разнородности экспериментальных линий, рассчитаны генетические дистанции и выполнен кластерный анализ (рис. 1). В соответствии с топологией филогенетического древа красноплодные и желтоплодные линии сформировали обособленные кластеры, что свидетельствует о различиях в селекционной истории и генетической основе исходных форм, а также о наличии специфичных наборов и сочетаний аллелей SSR- локусов. Возможно, некоторые специфичные наборы аллелей желтоплодных (Hpms2-13 171, 239, 255; Hpms1-5 320) и красноплодных кониче-

ских (Hpms1-5 318, 435) линий могут быть сцеплены с генами, определяющими окраску и форму плода.

Величина генетических расстояний варьировала среди красноплодных форм от 13,6 до 50,0 ед. Диапазон GD желтоплодных линий был немного уже и составил 18,4–43,4 ед. Обе группы линий делятся на 2 полиморфных подкластера. Минимальные дистанции характеризуют пары L2891 и L2893 (13,6 ед.), L3166 и L3167 (18,4 ед.).

Оценка состава редких и уникальных аллелей показала, что их наибольшая встречаемость (15 аллелей в 6 SSR-локусах) характерна для красноплодных линий. Для желтоплодных

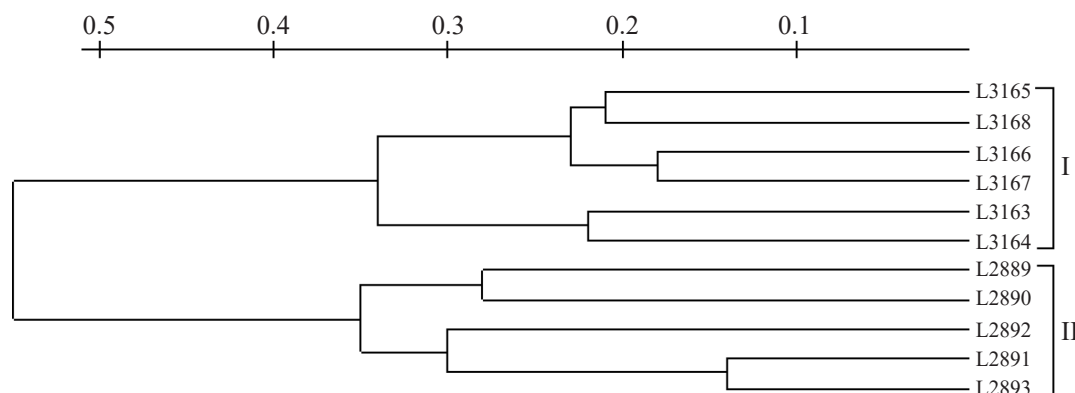


Рис. 1. Иерархическая кластеризация линий перца сладкого, выполненная по данным SSR-анализа

линий обнаружено 2 уникальных и 1 редкий аллель в двух SSR-локусах. Наиболее информативным для дифференциации красноплодных линий оказался маркер Hrms2-13 (3 редких и 2 уникальных аллеля).

Последующий анализ показал, что данные аллели не являются дифференцирующими для признаков окраски и формы плода для данной группы образцов и не могут рассматриваться в контексте этих признаков, вместе с тем их использование будет эффективным для типирования и паспортизации отдельных форм.

На основании оценки аллельного состава SSR-локусов были составлены генетические формулы родительских линий диаллельных гибридов, которые могут служить генетическими паспортами соответствующих красноплодных конических и желтоплодных линий:

**L2889:** A<sub>318</sub> B<sub>221,230</sub> C<sub>149,153</sub> D<sub>287,296</sub> E<sub>227</sub> F<sub>169,174</sub>  
 G<sub>154,167,190</sub> H<sub>217,229</sub> I<sub>327</sub> J<sub>391,397</sub> K<sub>247</sub> L<sub>186,193,255</sub>

**L2890:** A<sub>318</sub> B<sub>221,230</sub> C<sub>158,161</sub> D<sub>283,292</sub> E<sub>227</sub> F<sub>169,174,182</sub>  
 G<sub>154,167,190</sub> H<sub>217</sub> I<sub>240,327</sub> J<sub>391,397</sub> K<sub>247</sub> L<sub>174,186,255</sub>

**L2891:** A<sub>318</sub> B<sub>221,230</sub> C<sub>158,161</sub> D<sub>287,296</sub> E<sub>203</sub> F<sub>169,174,182</sub>  
 G<sub>154,167,190</sub> H<sub>229</sub> I<sub>327</sub> J<sub>391,397</sub> K<sub>247</sub> L<sub>174,186</sub>

**L2892:** A<sub>318</sub> B<sub>217,225</sub> C<sub>149,153</sub> D<sub>287,296</sub> E<sub>221</sub> F<sub>169,174,182</sub>  
 G<sub>154,167,190</sub> H<sub>229</sub> I<sub>327</sub> J<sub>391,397</sub> K<sub>247</sub> L<sub>174</sub>

**L2893:** A<sub>318</sub> B<sub>221,230</sub> C<sub>158,161</sub> D<sub>287,296</sub> E<sub>227</sub> F<sub>169,174,182</sub>  
 G<sub>154,167,190</sub> H<sub>229</sub> I<sub>327</sub> J<sub>391</sub> K<sub>247</sub> L<sub>174</sub>

**L3163:** A<sub>320,322</sub> B<sub>221,230</sub> C<sub>153,161</sub> D<sub>287</sub> E<sub>221,227,233</sub>  
 F<sub>169,174,182</sub> G<sub>154,167,190</sub> H<sub>229</sub> I<sub>327</sub> J<sub>391,397</sub> K<sub>255</sub> L<sub>186,193</sub>

**L3164:** A<sub>320</sub> B<sub>223</sub> C<sub>153,161</sub> D<sub>296</sub> E<sub>230</sub> F<sub>169,174,182</sub>  
 G<sub>154,167,190</sub> H<sub>229</sub> I<sub>330</sub> J<sub>391,397</sub> K<sub>255</sub> L<sub>186,193</sub>

**L3165:** A<sub>320</sub> B<sub>223</sub> C<sub>153</sub> D<sub>296</sub> E<sub>215,233</sub> F<sub>169,174</sub> G<sub>154,167,188</sub>  
 H<sub>229</sub> I<sub>240,330</sub> J<sub>391,397</sub> K<sub>255</sub> L<sub>255</sub>

**L3166:** A<sub>320</sub> B<sub>223</sub> C<sub>153</sub> D<sub>296</sub> E<sub>230</sub> F<sub>169,174,182</sub> G<sub>154,167,190</sub>  
 H<sub>229</sub> I<sub>330</sub> J<sub>397</sub> K<sub>255</sub> L<sub>186,255</sub>

**L3167:** A<sub>320</sub> B<sub>223,230</sub> C<sub>153</sub> D<sub>296</sub> E<sub>230</sub> F<sub>169,174,182</sub>  
 G<sub>154,167,190</sub> H<sub>229</sub> I<sub>327</sub> J<sub>397</sub> K<sub>255</sub> L<sub>174</sub>

**L3168:** A<sub>320</sub> B<sub>223</sub> C<sub>153,161</sub> D<sub>296</sub> E<sub>233</sub> F<sub>169,174,182</sub>  
 G<sub>154,167,188</sub> H<sub>229</sub> I<sub>240,327</sub> J<sub>397</sub> K<sub>255</sub> L<sub>174,186</sub>

#### Анализ проявления гетерозиса в поколении F<sub>1</sub>

Среди 20 гибридов красноплодных линий частота проявления гетерозиса в F<sub>1</sub> наиболее высокой была по массе и количеству плодов с растения и длине плода (таблица 2). Так, по массе плодов с растения 7 гибридов пока-

зали достоверный истинный гетерозис от 17,1 до 68,8%, 11 гибридов имели промежуточное наследование. Отрицательного гетерозиса по этому признаку не наблюдалось. По количеству плодов с растения достоверный истинный гетерозис от 19,2 до 42,8% отмечен у 5 гибридов из 20, тогда как 5 гибридов отличались от родителей в пределах ошибки, а оставшиеся 9 имели промежуточное наследование.

По средней массе (McpПл) и длине плода (ДлПл) частоты истинного гетерозиса были значительно ниже. Так, только одна гибридная комбинация L2889×L2890 показала истинный гетерозис по признаку «средняя масса плода», равный 20,2%. Из остальных 19 гибридов 12 имели промежуточное наследование, а у 7 отклонения от лучшего родителя были незначимыми. Гипотетический гетерозис в среднем был равен 20,3% по массе плодов с растения и колебался от –35,7% до 101,6%. По количеству плодов с растения в среднем равнялся 12% и колебался в пределах от –30% до 47%. По признаку McpПл 4 гибрида достоверно превосходили среднюю родителей на 13,6–30,5% и 2 имели отрицательные значения гипотетического гетерозиса. По признаку «длина плода» превосходство над родителями в диапазоне 12,3–31,1% показали 10 гибридов, остальные не имели значимых отличий.

Среди 30 диаллельных гибридов желтоплодных линий частота проявления гетерозиса была наиболее высокой по признакам «масса» и «количество плодов с растения» (табл. 3). Так, по массе плодов с растения истинный гетерозис в диапазоне от –13,8% до 68,4% проявляли 17 гибридов, и только один (L3164×L3167) был хуже худшего из родителей.

Одиннадцать гибридов превосходили лучшего родителя на 10–58,5% по количеству плодов с растения. Уровень гипотетического гетерозиса по массе плодов с растения в среднем равнялся 20,3% – потомство F<sub>1</sub> преимущественно превосходило среднюю родителей на 11,2–76,6%, за исключением двух комбинаций (L3164×L3167, L3165×L3164), проявляющих отрицательный гетерозис. По количеству плодов с растения 17 гибридов достоверно отличались от родителей на –10,3%–+71,1% и только один из них (L3163×L3167) был

Таблица 2

Характеристика диаллельных гибридов F<sub>1</sub> схемы 5×5 по уровню проявляемого гетерозиса

Гибрид	Гипотетический гетерозис, %				Истинный гетерозис, %			
	МПР	КПР	МсрПл	ДлПл	МПР	КПР	МсрПл	ДлПл
L2889×L2890	101,6**	46,7**	24,8*	15,9*	68,8**	42,8**	20,2*	–
L2889×L2891	9,8	12,7*	0,3	23,2*	–	9,6	–	6,2
L2889×L2892	40,7**	13,0*	30,5**	21,8*	–	–	4,9	6,9
L2889×L2893	47,3**	27,9**	11,4	10,0	30,6**	19,2*	–	–
L2890×L2889	25,6*	24,0*	0,3	6,9	17,1*	20,8*	–	–
L2890×L2891	–6,1	13,7*	–14,2*	2,7	–	7,8	–1,7	1,9
L2890×L2892	–5,4	–8,8	6,9	25,8*	–	–	–	21,1*
L2890×L2893	6,8	–4,3	8,7	8,7	1,1	–	–	8,7
L2891×L2889	47,6**	45,0**	3,5	16,8*	27,5**	41,1**	–	0,8
L2891×L2890	9,0	9,6	1,5	11,1	0,3	3,9	–	10,6
L2891×L2892	12,1*	5,1	8,7	14,1*	–	–	0,4	10,8
L2891×L2893	22,1*	16,7*	5,9	1,9	18,5*	10,0	0,6	1,5
L2892×L2889	–35,7**	–30,0**	–2,1	9,0	–	–4,1	–	–
L2892×L2890	–11,7	–18,6*	13,6*	31,1**	–	–	–	26,5*
L2892×L2891	23,8*	22,4*	6,6	18,9*	–	–	–	16,2*
L2892×L2893	22,5*	26,3**	–5,6	6,5	–	–	–2,6	2,5
L2893×L2889	–2,9	2,9	–7,4	1,9	–	–	–	–
L2893×L2890	39,4**	14,3*	20,0*	12,3*	32,0**	–	1,7	12,3*
L2893×L2891	24,0*	47,0**	–15,6*	4,4	20,3*	38,6**	–10,9	4,5
L2893×L2892	–22,3*	–26,3**	1,5	25,7*	–	–	–	21,2*
Средняя	20,3*	12,0*	4,5	13,4*	33**	21,5*	4,2	9,1

Примечание. МПР – масса плодов с растения; КПР – количество плодов с растения; \* –  $p < 0,05$ ; \*\* –  $p < 0,01$ ; «–» – промежуточное наследование

Таблица 3

Характеристика диаллельных гибридов F<sub>1</sub> схемы 6×6 по уровню проявляемого гетерозиса

Гибрид	Гипотетический гетерозис, %				Истинный гетерозис, %			
	МПР	КПР	МсрПл	ДлПл	МПР	КПР	МсрПл	ДлПл
L3163×L3164	18,1*	–5,0	28,2**	13,5*	16,4*	–	22,1*	9,8
L3163×L3165	16,0*	27,0**	–10,8*	11,3*	2,1	17,8*	–	–
L3163×L3166	13,4*	10,7*	7,2	7,4	12,2*	–	–	–
L3163×L3167	–7,0	–10,3*	3,0	–7,4	–	–7,1	–	–
L3163×L3168	13,2*	5,3	6,0	5,6	7,4	–	4,6	2,2
L3164×L3163	18,1*	–5,0	28,2**	13,5*	15,9*	–	22,0*	9,8
L3164×L3165	26,3**	47,5**	–9,1	4	9,2	45,2**	–	–
L3164×L3166	27,9**	40,4**	–5,8	4,1	27,1**	29,1**	–1,2	–
L3164×L3167	–23,8*	–5,1	–19,8*	–3,1	–13,8*	–	–17,9*	–
L3164×L3168	26,3**	0,7	21,3*	13,2*	16,6*	–	13,9*	12,0*

## Окончание табл. 3

Гибрид	Гипотетический гетерозис, %				Истинный гетерозис, %			
	МПР	КПР	МсрПл	ДлПл	МПР	КПР	МсрПл	ДлПл
L3165×L3163	7,2	26,9**	-17,7*	11,4*	–	17,9*	–	–
L3165×L3164	-11,8*	-1,6	-11,9*	3	–	–	–	–
L3165×L3166	16,1*	42,8**	-13,8*	1,2	2,2	33,3**	-1,7	–
L3165×L3167	23,0*	29,6**	-6,3	1,2	18,5*	16,7*	–	–
L3165×L3168	34,9**	33,8**	-4,6	-13	24,2*	15,9*	–	-4,4
L3166×L3163	34,5**	18,9*	16,9*	28,4**	32,4**	3,6	6,6	17,3*
L3166×L3164	36,0**	36,0**	4,8	12,2*	34,8**	25,0*	4,8	5,8
L3166×L3165	19,6*	7,1	20,2*	-7,5	5,2	–	7,1	-5,8
L3166×L3167	15,1*	29,9**	-8,5	13,5*	4,3	9,8	-6,4	13,5*
L3166×L3168	32,4**	23,1*	6,4	-3,1	3,8	0,6	0,3	–
L3167×L3163	33,7**	13,8*	18,1*	33,7**	21,0*	10,0*	9,9	22,1*
L3167×L3164	11,2*	-8,8	22,6*	6,1	–	–	19,7*	–
L3167×L3165	20,3*	18,5*	-1,1	11,3*	16,2*	6,7	–	8,3
L3167×L3166	17,8*	29,9**	-4,6	-1,9	5,5	10,2*	-6,7	-1,9
L3167×L3168	14,1*	-4,5	17,4*	4,1	8,2	–	7,8	–
L3168×L3163	76,6**	71,1**	6,1	28,4**	68,4**	58,5**	4,7	24,2*
L3168×L3164	27,2**	4,2	19,8*	11	17,9*	–	12,5*	9,8
L3168×L3165	18,0*	0,7	10,9*	5	8,3	–	–	–
L3168×L3166	19,8*	8,2	11,6*	-9,3	13,0*	–	0,5	-3,3
L3168×L3167	25,1*	-1,3	24,1*	-3,1	18,0*	–	14,3*	–
Средняя	20,3*	16,2*	5,3	6,5	14,5*	18,3	5,8	6,6

Примечание. \* –  $p < 0,05$ ; \*\* –  $p < 0,01$ ; «–» – промежуточное наследование

значимо хуже. Лучшим, как по абсолютным значениям этих признаков, так и степени проявления гетерозиса, оказался гибрид L3168×L3163, который также имел самые высокие значения гипотетического гетерозиса. Данная межлинейная комбинация может быть рассмотрена в качестве кандидата конкурсного испытания.

По средней массе плода 6 гибридов достоверно превосходили лучшего родителя на 12,5–22,1%, а среднюю обоих родителей на 10,9–28,2% – 13 гибридов. Наибольшие значения истинного и гипотетического гетерозиса по этому признаку отмечены у прямых и реципрокных гибридов, полученных от линий L3163 и L3164. Лучшим по степени проявления гетерозиса для признака «длина плода» оказался гибрид L3168×L3163, который также хорошо себя зарекомендовал по массе и количеству плодов с растения.

*Оценка сопряженности генетической дивергенции (GD) с эффектом гетерозиса  $F_1$  перца сладкого*

Анализ связи SSR GD с эффектом гетерозиса красноплодных конических гибридов диаллельной схемы 5×5 показал, что генетическая дивергенция достоверно и положительно ассоциирована с уровнем истинного и гипотетического гетерозиса для таких признаков как «средняя масса плода» и «длина плода». При этом уровень детерминации гетерозиса по длине плода выше у прямых гибридов ( $r = 0,7$ ), а средней массы плода – у обратных ( $r = 0,62–0,7$ ) (табл. 4). Если не принимать во внимание реципрокные эффекты и включить в анализ все 20 диаллельных гибридов, можно увидеть, что достоверные связи GD сохраняются как для гипотетического ( $r = 0,62$ ), так и истинного ( $r = 0,52$ ) гетерозиса по признаку «длина плода».

Таблица 4

Корреляционный анализ SSR-дивергенции с абсолютными значениями признаков ( $x_{cp}$ ), эффектами гипотетического (ГГ) и истинного (ИГ) гетерозиса диаллельных гибридов  $F_1$

Показатель		Схема 5×5			Схема 6×6		
		Все гибриды	Прямые гибриды	Обратные гибриды	Все гибриды	Прямые гибриды	Обратные гибриды
$x_{cp}$	МПР	0,05	0,18	-0,11	-0,04	-0,26	0,18
	КПР	-0,06	0,23	-0,36	0,2	-0,19	0,42
	МсрПл	0,18	0,03	0,35	-0,34	-0,17	-0,48
	ДлПл	0,33	0,54	0,23	0,38*	0,14	0,6
ГГ	МПР	-0,31	-0,16	-0,43	0,04	-0,24	0,26
	КПР	-0,56**	-0,48	-0,67*	0,08	-0,25	0,38
	МсрПл	0,42*	0,25	0,62*	-0,13	0,04	-0,27
	ДлПл	0,62**	0,70*	0,55	0,56**	0,42	0,73**
ИГ	МПР	-0,32	-0,28	-0,36	0,12	-0,2	0,33
	КПР	-0,48**	-0,32	-0,61	0,1	-0,23	0,4
	МсрПл	0,47**	0,12	0,7*	0,01	0,04	0,01
	ДлПл	0,52**	0,71*	0,43	0,46**	0,22	0,55*

\* –  $p < 0,01$ ; \*\* –  $p < 0,05$

Для остальных исследованных признаков (масса плодов с растения, количество плодов с растения) положительных корреляций не обнаружено, напротив, преимущественно выявляются отрицательные связи, которые наиболее тесны между GD и признаком «количество плодов с растения».

При анализе предсказательного уровня SSR GD для диаллельных желтоплодных гибридов перца сладкого схемы 6×6 выявлено, что уровень дивергенции микросателлитных локусов, как и в случае схемы 5×5, имеет наибольшее значение в предопределении гибридного уровня по признаку «длина плода».

В результате оценки сопряженности SSR GD с гетерозисом  $F_1$  отмечено существование достоверных связей с абсолютным значением признака «длина плода»  $F_1$ , истинным и гипотетическим гетерозисом по этому признаку у обратных гибридов. Величина корреляционной связи достигает 0,73 для гипотетического и 0,55 для истинного гетерозиса. В целом, несмотря на значительный реципрокный эффект, связь GD с гипотетическим и истинным гетерозисом для всех

30 гибридов схемы 6×6 по признаку «длина плода» достигала значений 0,56 и 0,46 соответственно (табл. 4).

*Оценка сопряженности дифференциального полиморфизма (DP) с эффектом гетерозиса  $F_1$  перца сладкого*

На основе подсчета числа полиморфных локусов в каждой парной комбинации скрещивания мы исследовали вклад дифференциального полиморфизма SSR-локусов в реализацию гетеротического потенциала диаллельных гибридов (табл. 5), который позволяет оценить значение общей гетерозиготности поколения  $F_1$  для оптимального проявления гетерозиса.

Наши исследования выявили, что, как и в случае показателя GD, дифференциальный полиморфизм SSR-локусов имеет наибольшее значение для признака «длина плода». Вклад числа полиморфных локусов в проявление гипотетического гетерозиса по этому признаку достигает 46% ( $r^2$ , %), для истинного гетерозиса – несколько ниже (26%). Коэффициент соотношения числа полиморфных и мономорфных локусов предопределяет гетеротический потенциал гибридов  $F_1$  на 49% и 37%

Таблица 5

Корреляционный анализ дифференциального полиморфизма SSR-локусов перца сладкого и проявление гетерозиса в поколении F<sub>1</sub>

Выборка	Показатель (локусы)	X <sub>ij</sub>				Гипотетический гетерозис				Истинный гетерозис			
		МПР	КПР	МерПл	ДлПл	МПР	КПР	МерПл	ДлПл	МПР	КПР	МерПл	ДлПл
Схема 5×5													
Прямые и реципрокные гибриды	Полиморф.	0,12	0,10	0,09	0,36	-0,16	-0,42	0,35	0,68**	-0,15	-0,27	0,32	0,51*
	Мономорф.	-0,30	-0,11	-0,41	-0,45*	0,31	0,54*	-0,26	-0,68**	0,32	0,46*	-0,09	-0,62**
	Соотношение	0,16	0,08	0,19	0,46*	-0,23	-0,47*	0,30	0,70**	-0,21	-0,31	0,20	0,61**
Прямые гибриды	Полиморф.	0,23	0,35	-0,04	0,56	0,00	-0,23	0,20	0,75*	-0,02	-0,02	0,18	0,67*
	Мономорф.	-0,47	-0,46	-0,29	-0,55	0,14	0,31	-0,12	-0,61*	0,23	0,31	0,13	-0,69*
	Соотношение	0,25	0,32	0,06	0,65*	-0,11	-0,32	0,15	0,71*	-0,10	-0,13	0,06	0,75*
Реципрокные гибриды	Полиморф.	0,00	-0,17	0,23	0,27	-0,35	-0,56	0,58	0,62*	-0,37	-0,47	0,66*	0,44
	Мономорф.	-0,12	0,25	-0,53	-0,42	0,55	0,71*	-0,48	-0,74*	0,51	0,59	-0,52	-0,62
	Соотношение	0,04	-0,18	0,33	0,38	-0,41	-0,58	0,54	0,69*	-0,41	-0,46	0,52	0,55
Схема 6×6													
Прямые и реципрокные гибриды	Полиморф.	0,00	-0,01	0,06	-0,08	0,00	-0,09	0,07	0,07	-0,07	-0,12	0,06	-0,01
	Мономорф.	0,03	0,10	-0,05	-0,15	0,10	0,02	0,11	-0,06	0,18	0,14	0,13	0,04
	Соотношение	-0,01	-0,03	0,05	-0,03	-0,01	-0,07	0,03	0,07	-0,08	-0,13	0,02	-0,03
Прямые гибриды	Полиморф.	-0,04	-0,16	0,20	-0,12	-0,11	-0,23	0,15	0,09	-0,15	-0,21	0,22	-0,21
	Мономорф.	-0,26	-0,21	-0,12	-0,23	0,04	-0,16	0,28	0,04	0,27	-0,07	0,20	0,30
	Соотношение	0,04	-0,06	0,18	0,00	-0,08	-0,11	0,01	0,10	-0,15	-0,12	0,11	-0,26
Реципрокные гибриды	Полиморф.	0,03	0,07	-0,03	-0,05	0,09	0,05	0,01	0,06	-0,04	-0,04	-0,11	0,10
	Мономорф.	0,32	0,28	-0,01	-0,11	0,15	0,19	-0,04	-0,14	0,16	0,34	0,06	-0,10
	Соотношение	-0,06	-0,01	-0,03	-0,05	0,05	-0,03	0,06	0,07	-0,06	-0,14	-0,07	0,10

Примечание. X<sub>ij</sub> – средняя величина выражения абсолютного признака; КПР – число плодов с растением; \* – p < 0,05; \*\* – p < 0,01

для гипотетического и истинного гетерозиса соответственно. Наиболее тесные связи дифференциального полиморфизма с гетерозисом были отмечены для прямых гибридов – уровень детерминации ( $r^2$ , %) гипотетического гетерозиса для длины плода достигал 56%. Тесные связи также выявлены для коэффициента соотношения К и гетерозиса по этому же признаку.

Число мономорфных локусов положительно коррелировало с признаком «количество плодов с растения» и достоверно отрицательно с величиной гетерозиса по признаку «длина плода». Значение этого показателя усиливалось для обратных гибридов ( $r = 0,71$ ) и ослабевало для прямых. Схожие тенденции выявлены для средней массы плода, где достоверные положительные связи ( $r = 0,66$ ) обнаруживались между числом полиморфных локусов и истинным гетерозисом.

Оценка сопряженности анализируемых показателей в схеме  $6 \times 6$  каких-либо значимых ассоциаций не выявила. Вероятно, это связано с тем, что некоторая часть анализируемых SSR-локусов сцеплена с генетическими факторами, контролирующими реализацию признака «длина плода», на что косвенно указывает сопряженность SSR GD и дифференциального полиморфизма с гетерозисом и абсолютным выражением этого признака в  $F_1$ . Значение высокого уровня SSR GD и DP наиболее выражено для красноплодных конических форм, селекционный отбор среди которых направлен на увеличение признака «длина плода». Наличие отрицательных связей GD с массой и количеством плодов с растения выглядит закономерным при допущении существования сцепления между маркерами и признаком «длина плода», который не оказывает влияния на конечную продуктивность растения, так как не связан с признаками «масса плодов с растения» и «количество плодов с растения» ( $r_{5 \times 5} = 0,28$ ;  $0,05$ ;  $r_{6 \times 6} = 0,34$ ;  $0,23$ ) обеих схем. При этом в выборке конических форм признаки «длина плода» и «средняя масса плода» взаимозависимы ( $r = 0,51$ ), что также объясняет сопряженность гетерозиса последнего с генетической дивергенцией и дифференциальным полиморфизмом SSR-локусов.

Таким образом, результаты молекулярно-генетического исследования подтвержда-

ют целесообразность использования ДНК-маркирования для оценки генетической разнородности перца сладкого, поскольку при отсутствии информации о генетической составляющей исходного материала такой подход обеспечивает возможность идентификации величины генетического пула селекционных коллекций и отбора генетически неоднородного материала среди фенотипически сходных форм.

### Заключение

Полученные результаты свидетельствуют о том, что прогностический потенциал молекулярных маркеров варьирует в зависимости от признака. При этом значительная доля фенотипической вариации в  $F_1$  может быть объяснена полиморфизмом ДНК-локусов. Отсутствие тесных корреляций GD и DP с гетерозисом связано с такими особенностями количественных признаков, как полигенный контроль и низкая наследуемость. Учитывая, что реализация гетерозиса обусловлена кумулятивным действием многих генетических составляющих, т.е. является результатом экспрессии многих локусов с малыми эффектами, представляется перспективным проводить отбор исходного материала по локусам, ассоциированным с сопряженными с урожаем признаками. В целом, результаты молекулярно-генетического исследования подтверждают целесообразность использования ДНК-маркирования для оценки исходного материала и отбора перспективных комбинаций скрещивания в селекции перца сладкого на гетерозис.

### Список использованных источников

1. Хотылева, Л.В. Теоретические аспекты гетерозиса / Л.В. Хотылева, А.В. Кильчевский, М.Н. Шаптуренко // Вавил. журн. генетики и селекции. – 2016. – Т. 20, № 4. – С. 482–492.
2. Falconer, D.S. Introduction to quantitative Genetics / D.S. Falconer, T.F. Mackay. – 4<sup>th</sup> ed. – London: Longman Group Ltd, 1996. – P. 255.
3. Bohn, M. Genetic similarities among winter wheat cultivars determined on the basis of RFLPs, AFLPs, and SSRs and their use for predicting progeny variance / M. Bohn, H.F. Utz, A.E. Melchinger // Crop Sci. – 1999. – Vol. 39. – P. 228–237.

4. Melchinger, A.E. Genetic diversity and heterosis / A.E. Melchinger // Genetic and Exploitation of heterosis in Crop. – Amer. Soc. Agr., 1999. – P. 99–118.
5. Brachi, B. Linkage and association mapping of *Arabidopsis thaliana* flowering time in nature / B. Brachi // PLoS Genet. – 2010. – Vol. 6. – e1000940.
6. Prediction of hybrid performance in maize using molecular markers and joint analyses of hybrids and parental inbreds / T. Schrag [et al.] // Theor. Appl. Genet. – 2010. – Vol. 120 (2). – P. 451–461.
7. Improved Heterosis Prediction by Combining Information on DNA- and Metabolic Markers / T. Gärtner [et al.] // PLoS ONE. – 2009. – Vol. 4 (4). – e5220.
8. Grouping of accessions of Mexican races of maize revisited with SSR markers / J. Muminovic [et al.] // Theor. Appl. Genet. – 2006. – Vol. 113. – P. 177–185.
9. Lee, E.A. Re-examining the relationship between degree of relatedness, genetic effects, and heterosis in maize / E.A. Lee, M.J. Ash, B. Good // Crop Sci. – 2007. – Vol. 47 (2). – P. 629–635.
10. Genomic and metabolic prediction of complex heterotic traits in hybrid maize / C. Riedelsheimer [et al.] // Nat Genet. – 2012. – Vol. 44 (2). – P. 217–220.
11. Accuracies of genomic breeding values in American Angus beef cattle using K-means clustering for cross-validation / M. Saatchi [et al.] // Genetics Selection Evolution. – 2011. – Vol. 43. – P. 40.
12. Genomic prediction of breeding values when modeling genotype  $\times$  environment interaction using pedigree and dense molecular markers / J. Burgueño [et al.] // Crop Sci. – 2012. – Vol. 52. – P. 707–719.
13. Key DNA markers for predicting heterosis in F1 hybrids of japonica rice / Y.I. Cho [et al.] // Breeding Sci. – 2004. – Vol. 54. – P. 389–397.
14. Prediction of Genetic Values of Quantitative Traits in Plant Breeding Using Pedigree and Molecular Markers / J. Crossa [et al.] // Genetics. – 2010. – Vol. 186 (2). – P. 713–724.
15. Characterisation and molecular genetic mapping of microsatellite loci in pepper / J.M. Lee [et al.] // Theor. Appl. Genet. – 2004. – Vol. 108. – P. 619–627.
16. Minamiyama, Y. An SSR-based linkage map of *Capsicum annuum* / Y. Minamiyama, M. Tsuru, M. Hirai. // Molecular Breeding. – 2006. – Vol. 18. – P. 157–169.
17. An SSR-based genetic map of pepper (*L.*) serves as an anchor for the alignment of major pepper maps / Y. Mimura [et al.] // Breed Sci. – 2012. – Vol. 62 (1). – P. 93–98.



M.N. Shapturenko<sup>1</sup>, T.V. Nikitinskaya<sup>1</sup>, T.V. Pechkovskaya<sup>1</sup>, L.A. Mishin<sup>2</sup>, A.V. Kilchevsky<sup>1</sup>, L.V. Khotyleva<sup>1</sup>

## POLYMORPHISMS OF MICROSATELLITES LOCI OF A SWEET PEPPER (*CAPSICUM ANNUUM* L.) IN RELATION TO F<sub>1</sub> HETEROTIC RESPONSE

<sup>1</sup>Institute of Genetics and Cytology, NAS of Belarus  
Minsk BY-220072, the Republic of Belarus

<sup>2</sup>Institute of Vegetable Growing  
Samokhvalovichy BY-223013, the Republic of Belarus

Prospects of using SSR markers for predicting the genetic potential of F<sub>1</sub> sweet pepper hybrids have been studied. It is shown that the estimation of SSR polymorphism can be useful, but has limitations, since only part of the heterozygous advantage of F<sub>1</sub> can be explained by the level of genetic divergence (GD) of their parents. To understand the genetic basis of heterosis and its effective practical use, it is necessary to detail the GD score for selecting “positive” markers, i.e. providing detection of those part of the heterogeneity that is associated with F<sub>1</sub> heterosis manifestation.

**Key words:** heterosis, F<sub>1</sub> performance, *Capsicum annuum*, SSR allelic variation.

*Дата поступления статьи: 13 октября 2017 г.*

И.А. Гордей<sup>1</sup>, О.М. Люсиков<sup>1</sup>, И.С. Гордей<sup>1</sup>, В.Е. Шимко<sup>1</sup>, А.В. Вершинин<sup>2</sup>, Е.В. Евтушенко<sup>2</sup>,  
Ю.А. Липихина<sup>2</sup>

## МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ СОЗДАНИЯ НОВОГО ГЕНОФОНДА РЖИ И РЖАНО-ПШЕНИЧНЫХ АМФИДИПЛОИДОВ СЕКАЛОТРИТИКУМ

<sup>1</sup>Институт генетики и цитологии НАН Беларуси  
Республика Беларусь, 220072, г. Минск, ул. Академическая, 27  
e-mail: I.Gordej@igc.by

<sup>2</sup>Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН  
Россия, 630090, г. Новосибирск, пр. Академика Лаврентьева, 8/2

Представлены результаты исследований по созданию и молекулярно-генетической характеристике нового генофонда сортов, самофертильных линий и гетерозисных гибридов озимой ржи и их зиготической аутополиплоидизации закисью азота ( $N_2O$ ) в качестве исходного материала для создания нового генофонда ржано-пшеничных амфидиплоидов с цитоплазмой ржи – секалотритикум, результаты сравнительного молекулярно-генетического анализа структуры и функциональной активности центромерных районов хромосом их геномов.

**Ключевые слова:** рожь, пшеница, тритикале, секалотритикум, аллополиплоиды, геном, цитогенетика, мейоз, центромера, центромерный гистон H3 (CENH3), экспрессия генов.

### Введение

Синтез секалотритикум является инновационным подходом к проблеме достижения сбалансированной экспрессии генетических систем исходных видов в условиях цитоплазмы ржаного типа, повышения адаптивности, расширения биоразнообразия и обогащения генофонда исходного материала гексаплоидных тритикале на основе включения генетического потенциала современных высококачественных сортов тетраплоидной ржи и ее цитоплазматических геномов.

В лаборатории цитогеномики растений Института генетики и цитологии НАН Беларуси проведены исследования по созданию новой формы гетероплазматических тритикале – гексаплоидных ржано-пшеничных амфидиплоидов секалотритикум с цитоплазмой ржаного типа (*Secalotriticum*,  $^S RRAABB$ ,  $2n=6x=42$ ). Нами разработана оригинальная методология синтеза секалотритикум ( $^S RRAABB$ ,  $2n=6x=42$ ) и тетраплоидных форм ржи с интрогрессией генетического материала пшеницы ( $R'R'RR$ ,  $2n=4x=28$ ) на основе утилизации частично нередуцированных 21-хромосомных RAB-гамет ржано-тритикальных пентаплоид-

ных гибридов  $F_1$  ( $^S RRABR'$ ,  $5x=35$ ) при беккроссе на гексаплоидные тритикале [1] и тетраплоидную рожь [2] соответственно.

Для создания генофонда исходного материала в работе по синтезу секалотритикум использовали современные высокопродуктивные диплоидные сорта, созданные нами перспективные самофертильные линии, а также гибриды диплоидной и новые формы тетраплоидной озимой ржи.

### Материалы и методы

Секалотритикум создавали на основе гибридизации тетраплоидной ржи ( $^S RRRR$ ,  $2n=4x=28$ ) с гексаплоидными тритикале ( $^T AABVRR$ ,  $2n=6x=42$ ) с последующим однократным беккроссом ржано-тритикальных гибридов  $F_1$  ( $^S RRABR$ ,  $5x=35$ ) на тритикале (рис. 1).

Тритикале выступали в качестве вида-посредника (bridge species) – источника геномов пшеницы и ингибитора S-РНК-аз ржи, что позволило преодолеть одностороннюю прогамную несовместимость ржи с пшеницей.

Исходные формы тетраплоидной ржи создавали с использованием метода зиготической аутополиплоидизации (первое деление

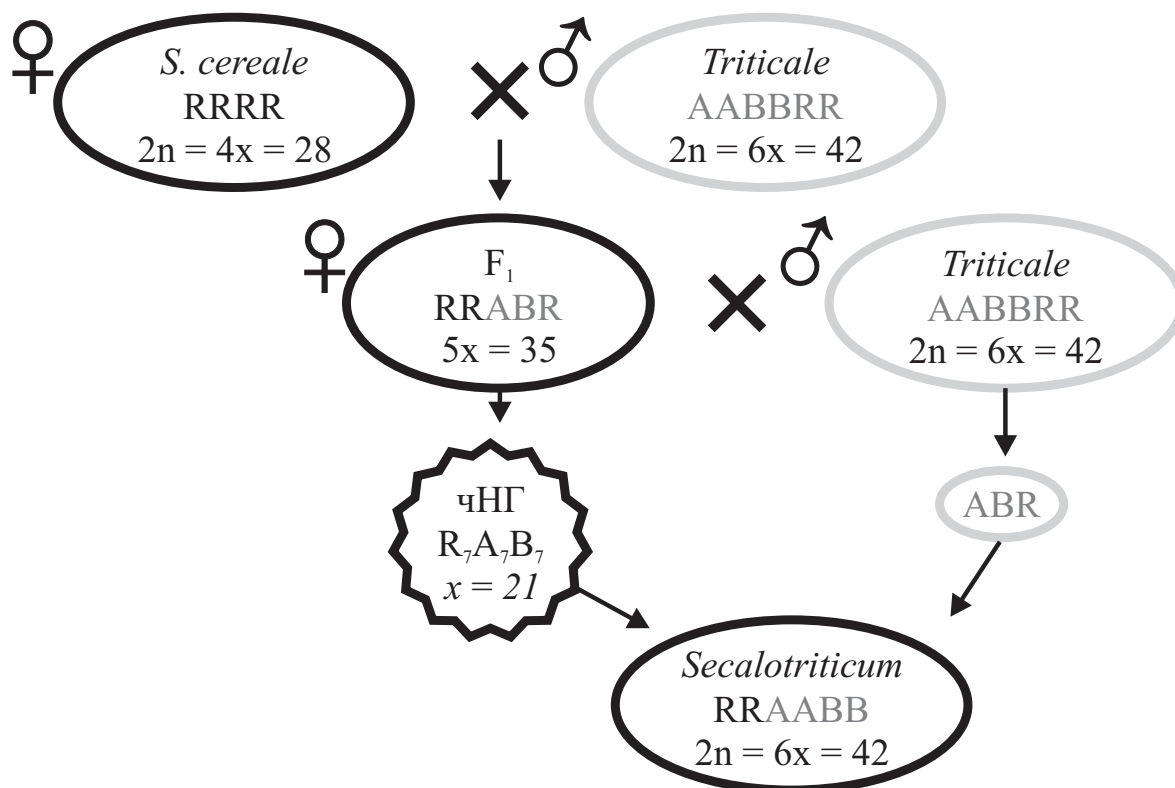


Рис. 1. Схема создания секалотритикума

зиготы) закисью азота ( $N_2O$ ) на материале современных высокопродуктивных сортов, созданных нами гетерозисных гибридов и СФ-линий озимой ржи [3]. Самофертильные линии диплоидной ржи получали на основе скрещиваний перспективных сортов с источником генов самофертильности (sf). Для выделения самосовместимых мужски стерильных (МС) форм на основе ЦМС Р- и G-типов и самофертильных (СФ) линий проведена идентификация S(1R)-, Z(2R)- и T(5R)-локусов с помощью молекулярных SSR- и STS-маркеров.

Цитологический анализ ключевых этапов микроспорогенеза и определение фертильности пыльцы проводили, соответственно, на давленных препаратах апикальных меристем корня и пыльников, окрашенных 2%-ным раствором ацетокармина в 45%-ной уксусной кислоте. Изучали следующие показатели цитогенетической стабильности генома аллоплоидов: ассоциации хромосом в прометафаза мейоза – униваленты, закрытые (кольцевые) и открытые (линейные) биваленты, мультиваленты; происхождение унивалентов (асинаптические, десинаптические); тип

деления и сегрегации унивалентов (эквацционное, редуционное); специфичность, уровень и характер нарушений на стадиях мейоза – профаза (диакinesis), метафаза I (M1), анафаза I (A1), метафаза II (MII), анафаза II (AII), тетрады микроспор (Т); сегрегация и элиминация хромосом.

Молекулярный анализ проводили с выделением тотальной РНК, приготовлением на ее основе кДНК, Real-time PCR-амплификацией со специфическими праймерами для получения последовательностей консервативного и варибельного доменов CENH3 (центромерная модификация гистона H3 у растений). Клонировали и секвенировали кодирующие последовательности N-концевого участка последовательности гена CENH3 у пшенично-ржаных амфиплоидных растений и их родительских форм, так же, как из тетраплоидной ржи, гексаплоидного тритикале и ржано-пшеничных гибридов, секалотритикума. Экспрессию гена CENH3 оценивали методом ПЦР в режиме реального времени, синтез белков *in vitro* осуществляли с использованием системы от New England Biolabs (США).

### Результаты и обсуждение

Исследования по созданию качественно нового генофонда самофертильных форм ржи проводили с целью дальнейшего использования в селекции на гетерозис. Попытки получения инцухт-линий путем принудительного самоопыления популяционных сортов ржи не приводили к желаемым результатам из-за самонесовместимости ржи и сильной инбредной депрессии. Преодолеть барьеры несовместимости удалось путем использования источников самофертильности (СФ), найденных в ряде популяций ржи.

С целью исследования S-локуса самонесовместимости мужски стерильных и самофертильных линий проведено тестирование SSR-маркеров SCM9, SCM39, разработанных В. Saal и G. Wricke (1999) [4] и маркеров R1–R2, разработанных Р. Wehling и др. (1994) [5]. SSR-маркеры SCM9, SCM39 расположены близко к изозимному локусу *Per7*, который связан с S-локусом (1R) несовместимости ржи. Известно о наличии 5 аллелей для SSR-маркера SCM9. В наших исследованиях SSR-маркер SCM9 детектировал фрагменты 209 п.о. и 220 п.о. Пшеница Кавказ и популяционный сорт ржи Зарница детектировали фрагменты 209 п.о. и 220 п.о. (табл. 1). У большинства МС-линий на основе ЦМС G-типа выявлен фрагмент 220 п.о. МС-линии на основе ЦМС Р-типа характеризовались наличи-

ем фрагментов 209 п.о. и 220 п.о. Показано наличие 2 аллелей SSR-маркера SCM9 у трех СФ-линий (А56, Па74, 476/8).

Известно, что SSR-маркер SCM39 расположен на расстоянии 4–5 сМ от центромеры, имеющей невысокий уровень рекомбинационных процессов. По данным Saal и Wricke (1999) SSR-маркер SCM39 детектировал фрагмент 230 п.о. [4]. В наших исследованиях данного маркера определялись два фрагмента длиной 188 п.о. и 239 п.о. В большинстве исследуемых линий показано наличие фрагмента 239 п.о. и только у двух линий (МС51, О25) выявлен фрагмент размером 188 п.о. Маркерные последовательности SCM39 не определялись в сорте пшеницы Кавказ, поскольку данный маркер находится в прицентромерной области плеча 1RL хромосомы ржи.

Маркеры R1-R2, использованные для идентификации S-локуса несовместимости у инбредных линий ржи, детектировали фрагмент размером 280 п.о., полностью коррелирующий с исходными S-генотипами. В наших исследованиях наблюдаемые фрагменты этого маркера варьировали от 167 п.о. до 320 п.о. изучаемых форм (табл. 1). Выявленный полиморфизм анализируемых маркеров подтверждает многоаллельность S-локуса несовместимости озимой ржи, и связан как с различным генетическим происхождением исследуемых форм, так и с перекрестным способом опыления растений.

Таблица 1

Аллельный состав МС- и СФ-форм по SSR-маркерам, ассоциированным с S-локусом несовместимости

№	МС/СФ-линии	Маркеры		
		SCM9, п.о.	SCM39, п.о.	R1-R2, п.о.
МС-линии				
1	МС1	220	239	167, 320
2	МС8	220	239	167, 320
3	МС10	220	239	167, 320
4	МС12	220	239	167, 290, 320
5	МС16	209, 220	239	320
6	МС22	220	239	167, 320
7	МС51	209	188	167, 320
8	МС98	220	239	167, 320
9	МС5с	209, 220	239	320

## Окончание табл. 1

№	МС/СФ-линии	Маркеры		
		SCM9, п.о.	SCM39, п.о.	R1-R2, п.о.
СФ-линии				
10	H5	220	239	167, 290, 320
11	H14	220	239	320
12	O25	220	188	–
13	O27	220	239	320
14	T40	209	239	167, 290, 320
15	A56	209, 220	239	167, 290, 320
16	Пл71	220	239	290, 320
17	Па74	209, 220	239	167, 290, 320
18	469/3	209	239	320
19	469/8	209, 220	239	320
20	476/8	209	239	320
Контроль				
Зарница (рожь)		209, 220	239	167, 320
Кавказ (пшеница)		209, 220	–	–

Одним из важных факторов при селекции гибридов  $F_1$  является их способность давать стабильную урожайность в изменяющихся условиях окружающей среды. Сравнительный анализ гибридов  $F_1$ , полученных с использованием маркированных МС-линий на основе ЦМС Р- и G-типа и СФ-линий озимой ржи, позволил выявить различия гибридных форм по некоторым количественным признакам зерновой продуктивности растений (табл. 2).

Снижение высоты растений отдельных гибридов  $F_1$  связано с наличием генов доминантной короткостебельности (*Hll/Ddw1*) у родительских СФ-линий (Т40, Па74, 469/3). Отмечено

увеличение кустистости на 12% у исследуемых гибридов на основе ЦМС G-типа, что оказывало влияние на общую продуктивность растений. Озерненность колоса у исследуемых гибридов на основе ЦМС G-типа варьировала от 73% до 88%, и зависела от материнского генотипа МС-формы. Установлено, что снижение озерненности на 31% у гибридов  $F_1$  на основе ЦМС Р-типа связано с более сложным контролем Р-ЦМС ядерных генов и выраженными нарушениями в митохондриальном геноме. Гибриды  $F_1$ , полученные на основе МС-форм G-типа, превышали гибриды на основе ЦМС Р-типа по массе зерна с колоса в среднем в 1,6 раза.

Таблица 2

Характеристика количественных признаков зерновой продуктивности межлинейных гибридов  $F_1$  озимой ржи

Комбинации скрещивания		Высота растений, см	Кустистость, ст./раст.	Озерненность колоса, %	Масса		Зерновая продуктивность, г/м <sup>2</sup>
МС-формы	СФ-линии				Колоса, г	1000 зерен, г	
ЦМС G-типа	H5	136	6	83,7	2,3	37,3	768,7
	H14	148	9	74,4	1,5	30,3	383,0
	O25	142	11	76,1	1,7	30,5	503,0
	O27	140	13	79,5	1,8	33,8	572,3

## Окончание табл. 2

Комбинации скрещивания		Высота растений, см	Кустистость, ст./раст.	Озерненность колоса, %	Масса		Зерновая продуктивность, г/м <sup>2</sup>
МС-формы	СФ-линии				Колоса, г	1000 зерен, г	
ЦМС G-типа	T40	100	10	74,3	1,9	28,6	436,6
	A56	105	8	79,9	1,9	29,5	632,5
	Пл71	128	6	73,6	1,8	37,6	563,3
	Па74	101	9	88,9	2,3	32,3	649,9
	469/3	107	8	81,4	1,9	26,9	514,8
	469/8	145	8	87,7	2,3	29,2	570,9
	476/8	142	9	84,	3,1	28,5	567,4
Среднее		126,7 ± 5,8	8,8 ± 0,6	80,4 ± 1,6	2,0 ± 0,1	31,3 ± 1,1	560,2 ± 35,7
ЦМС Р-типа	H5	140	7	62,3	1,4	33,1	292,3
	H14	140	6	81,5	1,8	31,6	397,0
	O25	147	9	47,3	1,4	37,2	177,1
	O27	125	5	27,0	0,5	29,2	230,9
	T40	85	5	58,3	0,9	20,9	310,4
	A56	134	6	47,9	1,2	35,5	414,9
	Пл71	132	7	74,9	2,0	38,7	628,1
	Па74	100	14	71,6	1,6	30,2	278,1
	469/3	105	8	57,2	1,3	33,8	180,6
	469/8	142	8	51,0	1,2	33,2	355,6
	476/8	141	10	29,5	0,8	34,9	396,5
Среднее		126,5 ± 6,1	7,7 ± 0,7	55,3 ± 5,2	1,3 ± 0,1	32,6 ± 1,4	332,6 ± 38,8
Сорт Зарница		128	10	37,9	1,2	47,0	453,7

Масса 1000 зерен составляла в среднем 31,2 г у гибридов F<sub>1</sub> на основе форм ЦМС G-типа и 32,6 г – у гибридов F<sub>1</sub> на основе ЦМС Р-типа, но не превышала этот показатель у сорта Зарница. Зерновая продуктивность гибридов на основе ЦМС G-типа превышала сорт-контроль у 81% образцов. Установлено, что по признакам зерновой продуктивности показатели большинства исследуемых гибридов F<sub>1</sub> на основе ЦМС Р-типа не превышали сорт Зарница. Наиболее стабильной зерновой продуктивностью характеризовались гибриды F<sub>1</sub>, полученные на основе скрещиваний МС-форм Р-, G-типов и СФ-линии Пл71, что обусловлено их генетической совместимостью.

Проведенные исследования позволили выявить генотипическую специфичность ядерно-цитоплазматических взаимодействий генетических систем ЦМС (Ms) и самофертильности

(Sf) у озимой ржи при формировании гетерозисных гибридов, что будет способствовать целенаправленному созданию высокопродуктивных гетерозисных гибридов. Совместно с РУП «НПЦ НАН Беларуси по земледелию» создан первый отечественный гибридный сорт озимой ржи Плиса F<sub>1</sub>.

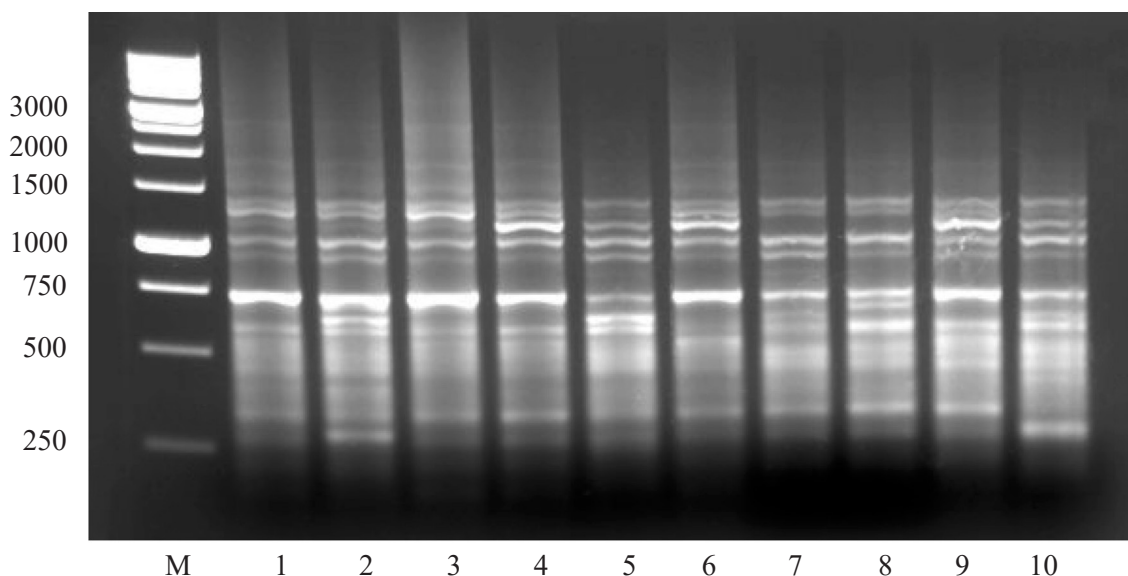
Созданные нами СФ-линии и гибриды, а также современные высокопродуктивные диплоидные сорта использовали для создания нового генофонда тетраплоидной ржи. Дупликацию генома ржи осуществляли с использованием метода зиготической аутополиплоидизации (первое деление зиготы) закисью азота (N<sub>2</sub>O). Выход тетраплоидов составил в среднем 43,5% и до 85,7% в зависимости от генотипической специфичности сорта и гибрида F<sub>1</sub>. Метод характеризуется низким уровнем анеуплоидии, не превышающим 10%.

Осуществлен перевод на тетраплоидный уровень лучших современных сортов (Алькора, Юбилейная, Зарница и др.) и гибридов ( $F_1$  Плиса,  $F_1$  Валдай  $\times$  Каупо) озимой диплоидной ржи [3]. Однако селекционно-генетические эффекты зиготической аутополиплоидизации ржи не исследованы: недостаточно изучена эффективность метода зиготической аутополиплоидизации закисью азота ( $N_2O$ ); не исследована генотипическая специфичность современных сортов, гибридов  $F_1$  и самофертильных (*sf*) линий по реакции на аутополиплоидизацию.

Нами проведено молекулярное генотипирование диплоидов и тетраплоидов ржи с использованием RAPD-праймеров, которое позволило выявить у них общие и специфические фрагменты ДНК. Получено 82 ампликона (амплифицированных фрагментов ДНК), число которых варьировало от 8 до 15 в зависимости от генотипа и праймера. Их электрофоретическая подвижность составляла от 200 до 3000 п.н., но подавляющее большинство фрагментов находились в пределах 500–1500 п.н. Наиболее высокой долей полиморфных локусов характеризовался праймер P 36 (83,3%), наименее высокой – RLZ 7 (25,0%). Средняя доля полиморфных ампликонов по всем 7 RAPD-праймерам со-

ставляла 45,9%. Количество уникальных ДНК-спектров ( $T_p$ ) для каждого праймера варьировало от 3 до 8, средний показатель по всем праймерам составил 5,6 спектра/праймер (рис. 2).

Данный набор RAPD-праймеров использовали для определения уровня полиморфизма между диплоидами ржи и созданными на их основе тетраплоидами (табл. 3). Наибольший полиморфизм обнаружен между диплоидом и тетраплоидом Зарница (25,6%), наименьший – между диплоидом и тетраплоидом Плиса (14,0%). Средний уровень полиморфизма между всеми анализируемыми диплоидами и тетраплоидами составил 20,4%. Обнаруженные различия в спектрах амплифицированных фрагментов ДНК диплоидов и тетраплоидов свидетельствуют о структурных изменениях генома ржи при дупликации. На основе тетраплоидного образца Юбилейная совместно с РУП «НПЦ НАН Беларуси по земледелию» получен сорт Камяя 16, который с 2016 года проходит испытание в ГУ «Государственная инспекция по испытанию и охране сортов растений». Созданные тетраплоиды современных высокопродуктивных сортов и гетерозисных гибридов ржи использовали для синтеза новых форм ржано-пшеничных амфидиплоидов секалотритикум, скрещивая в качестве мате-



**Рис. 2.** RAPD-спектр амплифицированных фрагментов ДНК растений с использованием праймера ОРА 5  
1 – Юбилейная 4х; 2 – Плиса 4х; 3 – Алькора 4х; 4 – Зарница 4х; 5 – Валдай  $\times$  Каупо 4х; 6 – Юбилейная 2х; 7 – Плиса 2х; 8 – Алькора 2х; 9 – Зарница 2х; 10 – Валдай  $\times$  Каупо 2х; М – маркер молекулярного веса M1KB DNA Ladder Plus (Fermentas)

ринской формы с гексаплоидными тритикале. На основе полученных ржано-тритикальных 35-хромосомных гибридов  $F_1$ , при цитогенетическом контроле особенностей мейоза всех гибридных генотипов, получали первичные секалотритикум путем однократного беккросса на исходные тритикале.

Следует отметить, что цитогенетические исследования у ржано-тритикальных гибридов  $F_1$  с необычным дипло-гаплоидным составом генома ( $S^R R A B R$ ,  $5x = 35$ ) наиболее информативны, тогда как специфичность мейоза у диплоидов (полиплоидов) выявляется трудно из-за единообразия гамет по хромосомному составу, а полигаплоиды практически стерильны. Нами показано, что у ржано-тритикальных гибридов  $F_1$  формируется широкий спектр функциональных (жизнеспособных и фертильных) гамет различного хромосомного состава. При этом основным фактором нормализации мейоза и частичной фертильности гибридных растений  $F_1$  (а также ржано-пшеничных амфиплоидов  $F_1 BC_{1-2}$ ) является наличие базового генома ржи в диплоидном состоянии, а геномно-хромосомный состав их гамет определяется генотипической специфичностью мейоза гибридов  $F_1$  различных комбинаций скрещивания в условиях цитоплазмы ржаного типа. Установлено, что генотипическая специфичность взаимодействия систем контроля мейоза пшеницы и ржи (*Ph*, *Sy*, *Edu* и др.)

является основой реализации у ржано-тритикальных гибридов цитогенетического механизма частичной мейотической нередукции в гаметогенезе с частотой 15–20% (до 35% на комбинацию и до 50% и более на растение в зависимости от генотипа гибрида). При этом имеет место неслучайная сегрегация и формирование гамет с полным набором хромосом R-, A-, B-геномов ( $n = 21$ ). Частично нередуцированные RAB-гаметы (чНГ) участвуют в формировании сбалансированного генома секалотритикум уже в первом поколении возвратного скрещивания ржано-тритикальных гибридов  $F_1$  на тритикале (ABR-гаметы) [1, 6, 7].

Специфичность мейоза ржано-тритикальных гибридов  $F_1$  определяется комплексом цитогенетических факторов, которые наследуются и определяют мейотическую стабильность последующих поколений ржано-пшеничных амфиплоидов  $F_1 BC_{1-2}$  и линий амфидиплоидов секалотритикум:

- происхождение унивалентов – преимущественно поздние униваленты в прометафазе в результате десинапсиса бивалентов в условиях цитоплазмы ржаного типа;
- тип полярной ориентации центромер унивалентов – сохранение униполярной ориентации центромер поздних десинаптических унивалентов;
- тип деления унивалентов – преимущественно редукционное первое мейоти-

Таблица 3

Сравнительная характеристика тетраплоидов и диплоидов по полиморфизму ДНК с использованием набора из 7 RAPD-праймеров

Образец	Мономорфных ампликонов, шт.	Полиморфных ампликонов, шт.	Уровень полиморфизма, %
Алькора 2х	49	11	22,4
Алькора 4х			
Плиса 2х	50	7	14,0
Плиса 4х			
Зарница 2х	43	11	25,6
Зарница 4х			
Юбилейная 2х	49	8	16,3
Юбилейная 4х			
Валдай × Каупо 2х	46	11	23,9
Валдай × Каупо 4х			



ческое деление десинаптических унивалентов в условиях генотипически специфичного взаимодействия генетических систем контроля мейоза пшеницы и ржи (*Ph*, *Sy*, *Edu*);

- особенности сегрегации и элиминации хромосом – эквационное второе деление мейоза и регулярная полярная сегрегация хромосом.

Указанные факторы частичной фертильности ржано-тритикальных гибридов  $F_1$  реализуются на основе ненарушенных цитогенетических и регуляторных механизмов мейоза. В итоге для секалотритикум характерна высокая динамика мейотической стабилизации генома: уже в  $F_{5-7}$  (15,2–16,7% аномальных мейоцитов в среднем) – на уровне исходных форм гексаплоидных тритикале (~14,6–15,3%) и тетраплоидной ржи (~12,9%) и завершающаяся в  $F_{7-9}$  (менее 9,4% аномальных мейоцитов в среднем).

Формы секалотритикум, созданные на основе частично нередуцированных 21-хромосомных RAB-гамет ржано-тритикальных гибридов  $F_1$ , наследуют от них генотипически обусловленный характер взаимодействия систем контроля мейоза исходных видов, от которых зависят динамика стабилизации и мейотическая стабильность генома. С использованием данной методологии на основе высокоурожайных сортов ржи и тритикале созданы и переданы в селекционный процесс в лабораторию тритикале НПЦ НАН Беларуси по земледелию уникальные линии секалотритикум. В настоящее время создан генофонд и проведена селекционно-генетическая оценка более 50 образцов секалотритикум. Созданные стабильные секалотритикум по продуктивности сравнимы или превосходят исходные тритикале, характеризуются сравнительно более широким диапазоном изменчивости и по некоторым признакам морфотипа более близки ко ржи. Линии идентифицировали с использованием дифференциального окрашивания хромосом (С-бэндинг) и рестрикционного анализа видоспецифических последовательностей цитоплазматической ДНК хлоропластов и митохондрий. Генофонд исходного материала ржи, тритикале и созданные формы секалотритикум маркировали по аллельному составу хозяйственно ценных генов короткостебельности (*H1/Ddw1* – у ржи,

*Rht-B1* – у тритикале и секалотритикум) и устойчивости к предуборочному прорастанию зерна (*Vp1B*).

В результате проведенных цитогенетических исследований экспериментально обосновано, что подавляющее большинство цитологических нарушений в мейозе отдаленных гибридов связано с центромерой – участком хромосом, отвечающим за точное распределение хромосом во время клеточного деления. Специфичность мейоза у отдаленных гибридов в значительной степени определяется мейотическим поведением и структурно-функциональной организацией центромер родительских хромосом и связанных с ними структур (кинетохоры, клеточные центры) в гибридном полигеноме.

Совместно с лабораторией молекулярной генетики Института молекулярной и клеточной биологии СО РАН начаты исследования молекулярной структуры и функциональной активности центромерных районов хромосом основных зерновых культур России и Беларуси – пшеницы, ржи и их гибридов, включая ржано-тритикальные амфилоиды и стабильные линии гетероплазматических гексаплоидных тритикале и секалотритикум. Установление видо- и генотипически специфичных факторов и возможных механизмов взаимосвязи уровня цитогенетической стабильности и продуктивности гетероплазматических тритикале со структурно-функциональным состоянием центромер их хромосом, имеющих различное родительское происхождение, имеет фундаментальное значение для целенаправленного синтеза продуктивных гибридов.

С молекулярной точки зрения центромера представляет собой многокомпонентный комплекс, состоящий из разнообразных классов последовательностей ДНК и белков. Если центромерная ДНК показывает варибельность между видами и даже между хромосомами одного кариотипа, то многие центромерные белки консервативны [8]. Среди таких белков, согласно исследованиям последнего десятилетия, особое место отводится центромерной модификации гистона H3, у растений обозначаемой как CENH3. Это особое положение обусловлено тем, что на молекулярном уровне наиболее специализированной, универсальной характеристикой активной центромеры явля-

ется присутствие CENH3 вместо канонического гистона H3 в нуклеосомах центромерного хроматина. CENH3 можно рассматривать как эпигенетическую «метку» центромеры [9]. В случае его потери не происходит формирования кинетохора и правильного расхождения хромосом в ходе деления клеток.

Белок CENH3, подобно каноническому гистону H3, состоит из двух доменов: консервативного, С-терминального (или HFD, histone-fold domain) и N-терминального, переменного. Нуклеотидные последовательности HFD CENH3 и канонического гистона показывают высокую степень подобия. Значительные отличия отмечены в N-терминальном домене, как по нуклеотидной последовательности ДНК, кодирующей домен, так и по размеру домена [10]. Столь же существенны и межвидовые различия в структуре данного домена. В составе консервативного домена находится район, ответственный за хромосомную локализацию центромеры – centromere targeting domain (CATD) [11]. CENH3 необходим для правильного формирования кинетохора в активной центромере – белковой структуры, к которой прикрепляется веретено деления [12]. Любая ошибка в транскрипции генов, кодирующих CENH3, трансляции, модификации или транспорте молекулы может повлиять на процесс сборки интактного центромерного хроматина, следствием чего будет потеря CENH3 из центромер и, соответственно, потеря идентичности центромер. В отличие от канонического гистона H3, CENH3 проявляет способность к быстрой адаптивной эволюции у некоторых видов [13]. Свойства аминокислотной последовательности белка CENH3 отличают его от канонических гистонов H3. Канонические гистоны H3 из различных видов высококонсервативны. Гистоны CENH3 высоко дивергированы, особенно в их N-терминальных доменах (N-terminal tail, NTT), которые не поддаются выравниванию из различных видов.

В последние годы накапливаются данные, указывающие, что CENH3 является одним из важнейших регуляторов взаимодействия двух различных родительских наборов хромосом в ядре, возникающем при межвидовой, межродовой (отдаленной) гибридизации. Как известно, одной из основных проблем отдаленной гибридизации является элиминация хромосом одного

из родительских видов, наблюдаемая даже после успешного оплодотворения и объединения двух геномов в гибридной клетке. Получение, размножение и поддержание таких гибридов, а также замещенных и дополненных линий часто затруднительно вследствие невозможности прохождения у них нормального мейоза. Получены экспериментальные подтверждения, что процесс элиминации хромосом у межвидовых гибридов ячменя *H. vulgare* × *H. bulbosum* сопровождается потерей CENH3 белков [14]. Молекулярные исследования показали, что элиминация последовательностей ДНК из генома ржи или потеря экспрессии генов ржи характерны для тритикале [15]. Приведенные данные указывают на важную функциональную роль гистона CENH3, в связи с чем исследование первичной структуры CENH3 у пшеницы, ржи и их аллополиплоидных гибридов, в частности, у секалотритикум с цитоплазмой ржаного типа, наследуемой от материнской формы ржи (*Secale cereale* L.), представляет большой научный и практический интерес.

В настоящее время нами отработана методология комплексного молекулярно-генетического анализа структуры консервативного и переменного доменов центромерного гистона H3/CENH3 и видоспецифичной интрон-экзонной структуры кодирующих их генов, транскрипционного профиля вариантов CENH3 и специфичности уровня межвидового кросс-включения молекул CENH3 в состав центромер хромосом у родительских форм и гибридов [16].

В табл. 4 и 5 представлены результаты сравнительного анализа экспрессии N-терминальной части гена *CENH3* у тритикале различного происхождения и пloidности и их родительских форм.

N-терминальный участок  $\alpha$ ScCENH3 последовательности имеет длину 213 п.о. Секвенирование случайно отобранных клонов из пшеницы и ржи показало 99% идентичности между CENH3 на нуклеотидном уровне. Но практически идентичные CENH3 ржи и пшеницы имеют специфические позиции. У пшеницы основные такие замещения расположены на позициях 82 и 84. Внутри открытой рамки считывания CENH3 ржи были идентифицированы четыре специфические замены (28, 73, 122 и 145 п.о.), эти замены несинонимичны.

Таблица 4

Распределение специфичных несинонимических SNP по позициям открытой рамки считывания N-терминального конца CENH3 у пшеницы (□), диплоидной ржи (▢) и октоплоидного тритикале

Растение	Число клонов	Количество форм CENH3 с SNP на следующих позициях ORF, %														
		28	32	50	56	73	82	84	88	99	122	130	145	176	182	188
Мягкая пшеница Triple Dirk D (AABBDD, 2n = 42)	18		11,1		5,6		55,6	55,6		27,8						
Диплоидная рожь Короткостебельная 69 (RR 2n = 14)	23					8,7	7,4	7,4		30,4			21,7	4,3		8,7
Октоплоидное тритикале S3:																
Растение 1 (2n = 56)	18	5,6		5,6		16,7	5,6	5,6		11,1	5,6		5,6			
Растение 2 (2n = 52)	6	16,7		16,7						16,7	33,3				16,7	
Растение 3 (2n = 54)	10	30	10				10									
Октоплоидное тритикале S4 (полученное из S3 растения 1):																
Растение 1 (2n = 56)	20	5		5		35	10	10		10	15		5	10		
Растение 2 (2n = 56)	20	10			5	30	10	10			10			20		
Растение 3 (2n = 49)	15		6,7			33,3	6,7	6,7		6,7		6,7	6,7			6,7
Октоплоидное тритикале S5 (полученное из S4 растения 2):																
Растение 1 (2n = 56)	14		7,1			50					7,1					

Таблица 5

Распределение специфичных несинонимических SNP по позициям открытой рамки считывания N-терминального конца CENH3 у тетраплоидной ржи, тритикале, секалотритикум и пентаплоидных гибридов

Растение	Число клонов	Число форм CENH3 с заменами на позициях ORF, % от общего количества секвенированных клонов														
		28	32	38	56	73	82	84	88	99	122	130	145	193	198	
Тетраплоидная рожь Верасень ( <sup>S</sup> RRRR, 2n = 28)	15		6,7			73,3					6,7			6,7		
Гексаплоидное тритикале Михась ( <sup>T</sup> AABBRR, 2n = 42)	13				7,7	7,7				15,4		15,4	15,4	7,7		
Секалотритикум F <sub>12</sub> STr1 ( <sup>S</sup> RRAABB, 2n = 42)	16					93,8					6,3					
Секалотритикум F <sub>12</sub> STr2 ( <sup>S</sup> RRAABB, 2n = 42)	12				8,3	50					8,3					
Секалотритикум F <sub>12</sub> STr3 ( <sup>S</sup> RRAABB, 2n = 42)	15		6,7			53,3	6,7	6,7	6,7	6,7		6,7			6,7	
Ржано-тритикальный гибрид F <sub>1</sub> Фламинго × Балтика ( <sup>S</sup> RRAABR, 5x = 35)	8		12,5	12,5		12,5	12,5	12,5	12,5	25	37,5				12,5	

## Окончание табл. 5

Растение	Число клонов	Число форм CENH3 с заменами на позициях ORF, % от общего количества секвенированных клонов													
		28	32	38	56	73	82	84	88	99	122	130	145	193	198
Ржано-тритикальный гибрид F <sub>1</sub> Фламинго × Вольтарио (8/RRABR, 5x = 35)	5						20	20	20		60				

Типично пшеничные замены на позициях 82 и 84 присутствуют у родительской формы ржи Короткостебельная 69, это может быть связано с высокой гетерогенностью этого сорта, эта замена очень редко встречается у CENH3 ржи.

Наблюдали, что в пшенично-ржаных амфиплоидах присутствуют все нуклеотидные замены, специфические для родительской формы ржи, несмотря на наличие материнской цитоплазмы пшеницы, а это значит, что синтез CENH3 белка ржи идет в цитоплазме пшеницы.

Распределение ржаных и пшеничных специфических SNP в последовательностях CENH3 из растений тетраплоидной ржи и секалотритикум указывает на предпочтительный синтез копий N-концевых последовательностей CENH3, характерных для ржи, хотя экспрессия отдельных форм может варьировать у разных растений.

Особый интерес представляет специфичное для ржаных последовательностей замещение в позиции 73 нуклеотидной последовательности  $\alpha$ CENH3, отсутствующей у родительского сорта пшеницы. У стабильных пшенично-ржаных амфидиплоидов, как правило, происходило накопление этой мутации. А у гибридных растений с цитоплазмой ржаного типа мы наблюдаем существенные изменения в представленности этой мутации. В результате этой замены протеин CENH3 теряет единственный предсказанный для N-концевого домена ржи сайт фосфорилирования серина. Накопление этой замены наблюдается как у стабильных 56-хромосомных растений тритикале, так и у секалотритикум.

Из двух вариантов пентаплоидных гибридов первый является более фертильным. Возможно, именно отсутствие постраницсионной модификации CENH3, уменьшая разнообразие форм CENH3, способствует прохождению мейоза в условиях сложного гибридного генома.

Таким образом, в результате комплексного молекулярно-генетического анализа структуры консервативного и варибельного доменов центрального гистона H3/CENH3 и видоспецифичной интрон-экзонной структуры кодирующих их генов у секалотритикум не были обнаружены копии NTT CENH3 с делециями. В полных последовательностях выявлены две специфические для ржи нуклеотидные замены, частота встречаемости которых значительно превышает таковую у гексаплоидного тритикале сорта Михась, что указывает на предпочтительный синтез полных копий NTT CENH3, характерных для родительской формы ржи, в геноме секалотритикум (рис. 3).

### Заключение

В результате проведенных исследований выявлен полиморфизм, подтверждающий многоаллельность S- и Z-локусов несовместимости озимой ржи. Сравнительный анализ гибридов F<sub>1</sub>, полученных с использованием МС-линий ЦМС Р- и G-типов и СФ-линий показал снижение озерненности (на 31%) у гибридов F<sub>1</sub> на основе ЦМС Р-типа, что связано с более сложным контролем Р-ЦМС ядерных генов и нарушениями в митохондриальном геноме. Выявлена генотипическая специфичность ядерно-цитоплазматических взаимодействий генетических систем ЦМС (Ms) и самофертильности (Sf) у озимой ржи при формировании гетерозисных гибридов.

Созданные СФ-линии и гибриды, наряду с современными высокопродуктивными сортами диплоидной ржи, после дубликации генома с использованием высокоэффективного метода зиготической (первое деление зиготы) аутополиплоидизации закисью азота (N<sub>2</sub>O) (выход тетраплоидов от 43,5% в среднем и до 85,7% в зависимости от генотипической специфичности сорта при уровне анеуплоидии, не

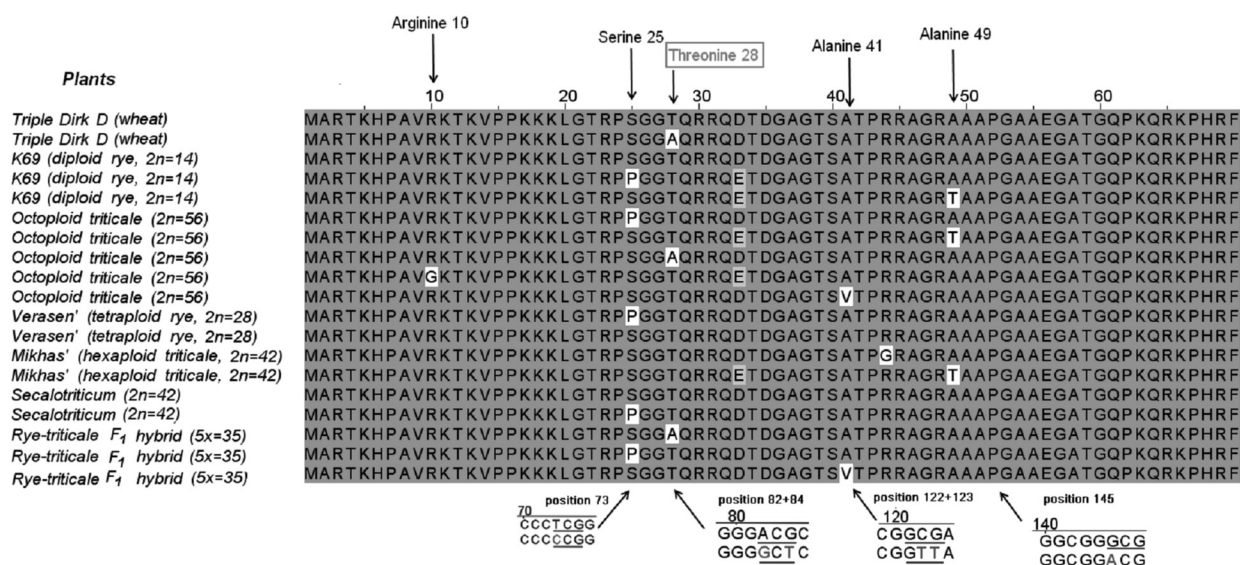


Рис. 3. Протеиновые замены в N-терминальной части центромерного белка CENH3 у гексаплоидной пшеницы, диплоидной и тетраплоидной ржи, октоплоидных тритикале, гексаплоидных секалотритикум и пентаплоидных ржано-тритикальных гибридов F<sub>1</sub>

превышающем 10%), являются качественным материалом для создания нового генофонда секалотритикум.

Генезис полиплоидных форм сопровождается различными генетическими и эпигенетическими изменениями, которые свидетельствуют о структурно-функциональных изменениях генома у полиплоидов и возможности создания исходного материала для селекции с разнообразным сочетанием хозяйственно-ценных признаков и свойств.

Проведенные исследования показали, что линии секалотритикум наследуют от исходных генотипов ржано-тритикальных гибридов F<sub>1</sub> цитогенетические особенности взаимодействия систем контроля мейоза исходных видов и стабильности генома. Поэтому рекомбинационная селекция секалотритикум на продуктивность, по хозяйственно ценным признакам и показателям ООС (тест на отличимость, однородность, стабильность) наиболее эффективна в рамках подвида (*ssp. Secalotriticum* Rozenst. et Mittelst., син. *Secalotriticum*), а скрещивания с тритикале приводят к снижению мейотической стабильности. Следовательно, селекция гексаплоидных ржано-пшеничных амфидиплоидов с цитоплазмой ржи должна развиваться в рамках самостоятельного направления. Секалотритикум могут выступать

новым источником стабильности генома в рекомбинационной селекции классических тритикале.

В результате сравнительного молекулярно-генетического анализа структуры и функциональной активности центромерных районов хромосом отмечены различия в молекулярной структуре N-терминального домена белка CENH3 у пшеницы и ржи, но они невелики. У гибридов происходит экспрессия обоих родительских форм CENH3. При этом существуют характерные различия в молекулярной структуре NTT CENH3 у мейотически стабильных и нестабильных гибридных форм. Окончательные выводы о том, какую роль играет молекулярная структура CENH3 в поддержании стабильности гибридных комбинаций ржи и пшеницы, делать рано. Неясно, происходит ли встройка всех экспрессируемых вариантов CENH3 в центромеры хромосом гибридов, хотя их участие в формировании новых гибридных геномов несомненно. Полученные экспериментальные результаты в изучении важнейших механизмов формирования гибридных растительных геномов являются обоснованием необходимости продолжения и углубления начатых совместных молекулярно-цитогенетических исследований.

Исследования выполнены при частичной финансовой поддержке гранта Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований №Б15СО-022, Российской программой фундаментальных научных исследований (проект 0310-2016-0005) и гранта Российского фонда фундаментальных исследований №17-04-00748а.

#### Список использованных источников

1. Гордей, И.А. Секалотритикум (*×Secalotriticum*): генетические основы создания и формирования генома / И.А. Гордей, Н.Б. Белько, О.М. Люсикив. – Минск: Беларуская навука, 2011. – 214 с.
2. Способ получения формы ржи с интрогрессией генетического материала пшеницы: пат. 20798 Респ. Беларусь, МПК А 01Н 1/00 / Н.Б. Белько, И.А. Гордей, И.С. Гордей // Афiцыйны бюл. / Нац. цэнтр інтэлектуал. Уласнасці. – 2017. – № 1. – С. 48.
3. Гордей, И.С. Создание тетраплоидов ржи (*S. cereale* L.,  $4x=28$ ) путем дупликации генома в зиготе / И.С. Гордей // Вести Национальной академии наук. Конференция «Молодежь в науке – 2013», 19-22 ноября 2013 г, Минск: Беларуская навука, 2014. – С. 39-42.
4. Saal, B. Development of simple sequence repeat markers in rye (*Secale cereale* L.) / B. Saal, G. Wricke // Genome. – 1999. – Vol. 42. – P. 964–972.
5. Wehling, P. Phosphorylation of pollen proteins in relation to self-incompatibility in rye (*Secale cereale* L.) / P. Wehling, B. Hackauf, G. Wricke // Sex. Plant Reprod. – 1994. – Vol. 7. – P. 67–75.
6. Люсикив, О.М. Анализ мейотической стабилизации генома ржано-пшеничных амфидиплоидов (*×Secalotriticum*, S/RRAABB,  $2n=42$ ) / О.М. Люсикив, И.А. Гордей // Генетика. – 2014. – Т. 50, № 7. – С. 794–801.
7. Люсикив, О.М. Цитогенетическая стабилизация генома секалотритикум (*×Triticosecale derzhavinii secalotriticum* Rozenst., et Mittelst., <sup>S</sup>RRAABB,  $2n = 42$ ) / О.М. Люсикив, И.А. Гордей // Цитология и генетика. – 2015. – Т. 49, № 2. – С. 48–55.
8. Building the centromere: from foundation proteins to 3D organization / D.J. Amor [et al.] // Trends Cell Biol. – 2014. – Vol. 14. – P. 359–368.
9. Allshire, R.C. Epigenetic regulation of centromeric chromatin: old dogs, new tricks? / R.C. Allshire, G.H. Karpen // Nat Rev Genet. – 2008. – Vol. 9. – P. 923–937.
10. Talbert, P.B. Evolution of centromeres and kinetochores: A two-part fugue / P.B. Talbert, J.J. Bayes, S. Henikoff // Kinetochores. – Berlin: Springer, 2008. – P. 1–37.
11. Loading of Arabidopsis centromeric histone CENH3 occurs mainly during G2 and requires the presence of the histone fold domain / I. Lermontova [et al.] // The Plant Cell. – 2006. – Vol. 18. – P. 2443–2451.
12. Henikoff, S. The centromere paradox: Stable inheritance with rapidly evolving DNA // S. Henikoff, K. Ahmad, H.S. Malik // Science. – 2001. – Vol. 293. – P. 1098–1102.
13. Malik, H.S. Major evolutionary transitions in centromere complexity / H.S. Malik, S. Henikoff // Cell. – 2009. – Vol. 138. – P. 1067–1082.
14. Loss of centromeric histone H3 (CENH3) from centromeres precedes uniparental chromosome elimination in interspecific barley hybrids / M. Sanei [et al.] // PNAS. – 2011. Vol. 108. – P. 498–505.
15. Identification and characterization of rye genes not expressed in allohexaploid triticales / H.B. Khalil [et al.] // BMC Genomics. – 2015. – Vol. 16. – P. 281–291.
16. Проявление активности гена центрального гистона H3 у аллополиплоидных гибридов пшеницы и ржи / Ю.А. Липихина [и др.] // Цитология. – 2016. – Т. 58. № 4. – С. 324–329.

I.A. Gordei<sup>1</sup>, O.M. Lyusikov<sup>1</sup>, I.S. Gordei<sup>1</sup>, V.E. Shimko<sup>1</sup>, A.V. Vershinin<sup>2</sup>, E.V. Evtushenko<sup>2</sup>,  
Yu.A. Lipikhina<sup>2</sup>

## MOLECULAR GENETIC BASIS FOR THE DEVELOPMENT OF THE NEW GENE POOL OF RYE AND WHEAT-RYE AMPHIDIPOIDS OF *SECALOTRITICUM*

<sup>1</sup>Institute of Genetics and Cytology, NAS of Belarus  
Minsk BY-220072, the Republic of Belarus

<sup>2</sup>Institute of Molecular and Cellular Biology SB RAS  
Novosibirsk, 630090, Russia

The research results on the development and molecular genetic characteristics of the new gene pool of cultivars, self-fertile lines and heterotic winter-rye hybrids and their zygotic autopolyploidization with nitrous oxide (N<sub>2</sub>O) as a starting material for the development of the new gene pool of wheat-rye amphidiploids with rye cytoplasm – *Secalotriticum*, the results of the comparative molecular genetic analysis of the structure and functional activity of the chromosome centromeric regions of their genomes are presented.

**Key words:** rye, wheat, triticale, *Secalotriticum*, allopolyploids, genome, cytogenetics, meiosis, centromere, centromere histone H3 (CENH3), gene expression.

*Дата поступления статьи: 23 августа 2017 г.*

Н.И. Дубовец<sup>1</sup>, Е.А. Сычева<sup>1</sup>, Н.И. Дробот<sup>1</sup>, Е.Б. Бондаревич<sup>1</sup>, Л.А. Соловей<sup>1</sup>, С.П. Халецкий<sup>2</sup>

## ХАРАКТЕРИСТИКА ИСХОДНОГО МАТЕРИАЛА ПО КОМПЛЕКСУ ПРИЗНАКОВ ДЛЯ СЕЛЕКЦИИ ОВСА ПОСЕВНОГО *AVENA SATIVA* L. МЕТОДОМ ОТДАЛЕННОЙ ГИБРИДИЗАЦИИ

<sup>1</sup>Институт генетики и цитологии НАН Беларуси

Республика Беларусь, 220072, г. Минск, ул. Академическая, 27, e-mail: n.i.dubovets@igc.by

<sup>2</sup>РУП «Научно-практический центр НАН Беларуси по земледелию»

Республика Беларусь, 222160, г. Жодино, ул. Тимирязева, 1

Представлены результаты оценки исходных родительских форм (сортов *Avena sativa* L. и образцов *Avena sterilis* L.) по ряду признаков, которые предполагается использовать в дальнейшей работе для подтверждения гибридности полученного материала и отбора наиболее перспективных для дальнейшей селекционной проработки генотипов. Приведены данные по особенностям морфологии образцов *Avena sterilis* L. и их устойчивости к стеблевой и корончатой ржавчине. Изучена цитологическая стабильность и генетический полиморфизм по SSR маркерам сортов *Avena sativa* L.

**Ключевые слова:** овес посевной *Avena sativa* L., *Avena sterilis* L., межвидовая гибридизация, устойчивость к болезням, цитологическая стабильность, SSR-маркеры

### Введение

Овес (*Avena sativa* L.) – одна из важнейших зерновых культур мира, занимающая по сумме посевных площадей пятое место после пшеницы, риса, кукурузы и ячменя. В Республике Беларусь овес посевной относится к числу значимых культур и выращивается на площади около 150 тысяч гектаров [1]. *Avena sativa* L. считается ценной продовольственной и зернофуражной культурой. В зерне овса содержится 12–15% белка, 40–45% крахмала, 4–6% липидов. Белок легко усваивается и отличается повышенным содержанием необходимых для организма человека аминокислот (аргинин, гистидин, лизин, триптофан). По сравнению с другими хлебными злаками зерно овса содержит значительно больше липидов, в составе которых преобладают линоленовая и олеиновая кислоты. Значительный ущерб урожаю и качеству продукции этой культуры наносят вредители и болезни. Среди болезней наиболее вредоносными являются корончатая и стеблевая ржавчина, в последние годы широкое распространение получила также красно-бурая пятнистость [2]. Самый эффективный, экономичный и безопасный способ борьбы с болезнями растений – создание устойчивых сортов. При этом наиболее пер-

спективным на настоящий момент представляется использование в качестве доноров целевых признаков дикорастущих сородичей *A. sativa* L., являющихся обширным источником генов устойчивости к различным абиотическим и биотическим стрессовым факторам, потенциал которых в селекции овса до сих пор не реализован. Особый интерес для селекции на устойчивость к болезням представляют дикорастущие гексаплоидные виды, которые имеют аналогичную *Avena sativa* L. геномную структуру (AACCCDD), что гарантирует получение в скрещиваниях фертильных гибридных форм.

В статье представлены результаты оценки по ряду признаков исходных родительских форм (сортов *Avena sativa* L. и образцов *Avena sterilis* L.), которые предполагается использовать в дальнейшей работе для подтверждения гибридности полученного материала и отбора наиболее перспективных для дальнейшей селекционной проработки генотипов.

### Материалы и методы

Материалом для исследований служили высокопродуктивные возделываемые в Республике Беларусь сорта овса посевного *Айвори*, *Бинго*, *Запавет*, *Лидия*, *Мирт* и *Фристайл*, а также



13 образцов *Avena sterilis* L. – источников устойчивости к корончатой и стеблевой ржавчине, полученных из мировой коллекции ВИР (табл. 1).

Исследование особенностей поведения хромосом овса на различных стадиях микроспорогенеза проводили на временных давленных препаратах, изготовленных по общепринятой методике [3] и окрашенных 4%-ным орсеином. Метелки срезали на стадии выхода на 1/3 из листового влагалища и фиксировали в этанол-уксусной смеси (3:1). Через сутки материал переносили в 70%-ный этиловый спирт, в котором и хранили до момента анализа при температуре +2–4 °С.

Выделение и очистку ДНК осуществляли с помощью готовых наборов реактивов Genomic DNA Purification Kit K0512 (Fermentas,

Литва). Для изучения генетического полиморфизма использовались SSR-маркеры, перечень которых и нуклеотидные последовательности праймеров к ним представлены в табл. 2.

Общий уровень качества прохождения реакции оценивали разделением продуктов ПЦР электрофорезом в 1,5%-ном агарозном геле в 1×ТАЕ буфере в течение 60 минут при напряжении в 80 В. Для точного определения размера амплифицируемых фрагментов был проведен стандартный фрагментный анализ при помощи прибора Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer (США). Данные анализировались в программной среде, поставляемой с прибором.

Оценка устойчивости *A. sterilis* L. к болезням проводилась по 9-ти бальной шкале.

Таблица 1

Перечень генотипов *Avena sterilis* L., включенных в рабочую коллекцию

№ образца по каталогу ВИР	Название	Страна происхождения	Наличие генов устойчивости
1870	CW 486	Тунис	<i>Pc-50</i>
1876	C.I. 8081	Португалия	<i>Pc-36,47</i>
1877	C.I. 8387	Израиль	<i>Pc-58</i>
1888	PI 287211	Израиль	<i>Pc-60,61</i>
1970	ME 1951	Турция	<i>Pc-54, Pg-15</i>
1977	EN 2145	Алжир	<i>Pc-68</i>
1978	F 033	Израиль	<i>Pc-55</i>
1981	F 169	Израиль	<i>Pc-45</i>
1982	F 290	Израиль	<i>Pc-46</i>
655	CAV 1975	Алжир	–
517	CAV 1360	Израиль	–
539	CAV 1414	Израиль	–
428	ME 1083	Иран	–

Таблица 2

Нуклеотидные последовательности праймеров для анализа полиморфизма овса

SSR-маркер	Прямой праймер	Обратный праймер
AM1	GGATCCTCCACGCTGTTGA-FAM	CTCATCCGTATGGGCTTTA
AM3	CTGGTCATCCTCGCCGTTCA-ROX	CATTTAGCCAGGTTGCCAGGTC
AM4	GGTAAGGTTTCGAAGAGCAAAG-TAMRA	GGGCTATATCCATCCCTCAC
AM5	TTGTCAAGCGAAATAAGCAGAGA-FAM	GAATTCGTGACCAGCAACAG
AM7	GTGAGCGCCGAATACATA-ROX	TTGGCTAGCTGCTTGAACCT
AM15	GTGACCGTAAACGATAACAAC-TAMRA	AAGCAAGACGCGAGAGTAGG

Статистическую обработку данных выполнили при помощи пакета анализа данных программы Microsoft Excel.

### Результаты и обсуждение

#### Сравнительная оценка морфологических признаков *A. sativa* и *A. sterilis*

Несмотря на внешнее сходство надземной части растений, виды *A. sativa* и *A. sterilis* имеют ряд отличительных морфологических признаков, которые проявляются главным образом на уровне строения генеративных органов. Как видно из рис. 1, для колосков *A. sterilis* характерно наличие двух грубых коленчатоизогнутых остей, в то время как у включенных в эксперимент сортов *A. sativa* ости отсутствуют.

Типичным для образцов *A. sterilis* является также сильное опушение основания первого и второго зерна (рис. 1а), отсутствующее у зерновок овса посевного (рис. 1б). Наблюдаются существенные различия и по окраске зерновки: среди сортов отмечены генотипы с белой и желтой окраской зерновки с преобладанием последней, а среди образцов *A. sterilis* преобладающей является серая окраска, за исключением образца СИ 8081 с коричневой окраской зерновки и образца МЕ 1083 с желтой окраской.

Но самыми существенными и значимыми для селекции являются различия по характеру основания цветковой чешуи зерна. У

образцов *A. sterilis* нижняя часть цветковой чешуи утолщена и образует вырост в виде подковки, которая обеспечивает осыпание зерна. При этом подковка присутствует только у нижнего (первого) зерна, вследствие чего колоски при созревании опадают цельными, не разделяясь на зерна. Поскольку цветение всех видов овса идет от верхушки метёлки до основания и процесс налива и созревания зерна растянут примерно на месяц, то у *A. sterilis* складывается следующая ситуация: когда в нижней части метелки идет налив зерна и колоски стабильно удерживаются на мутовках, верхние колоски созревают и, благодаря наличию подковки, осыпаются. Данное свойство в селекционной работе является отрицательным, поскольку для обеспечения механизированной уборки производственных посевов с потерями зерна, не превышающими нормативные, растения создаваемых сортов должны обеспечивать дружное созревание зерна и сохранение его в метелке без осыпания минимум в течение 5–7 дней. У *A. sativa* цветковые чешуи зерен выроста не имеют, подковка не образуется, вследствие чего он устойчив к осыпанию.

Долгое время считалось, что при гибридизации культурного овса с *A. sterilis* будет доминировать «дикий» тип отчленения колосков, что ограничивало использование в селекции этого ценного донора устойчивости



Рис. 1. Колоски *A. sativa* (слева) и *A. sterilis*

к болезням. На настоящий момент установлен доминантный характер наследования более «культурного» типа отделения колосков, включая различные промежуточные типы [2], что позволяет выделять из гибридного материала устойчивые к осыпанию зерна генотипы.

*Анализ цитологической стабильности сортов овса посевного *Avena sativa* L.*

Оценка цитологической стабильности является важной составляющей работ по созданию отдаленных гибридов. Это вызвано тем, что, с одной стороны, интрогрессия в геном культурного вида чужеродного генетического материала приводит к различным аномалиям процесса формирования гамет, что чревато потерей интродуцированного хроматина. С другой стороны, повышенная мейотическая нестабильность гибридов  $F_1$  по сравнению с исходной культурной формой нередко используется в качестве критерия гибридности полученного в скрещиваниях материала. В связи с этим у сортов овса посевного, включенных в исследование в качестве материнских компонентов гибридизации, были изучены особенности поведения хромосом на различных стадиях микроспорогнеза.

Как видно из данных табл. 3, наиболее высокой цитологической стабильностью на стадии метафазы I мейоза характеризовались сорта Запавет и Фристайл, у которых уровень бивалентной конъюгации составил 100% (рис. 2.1).

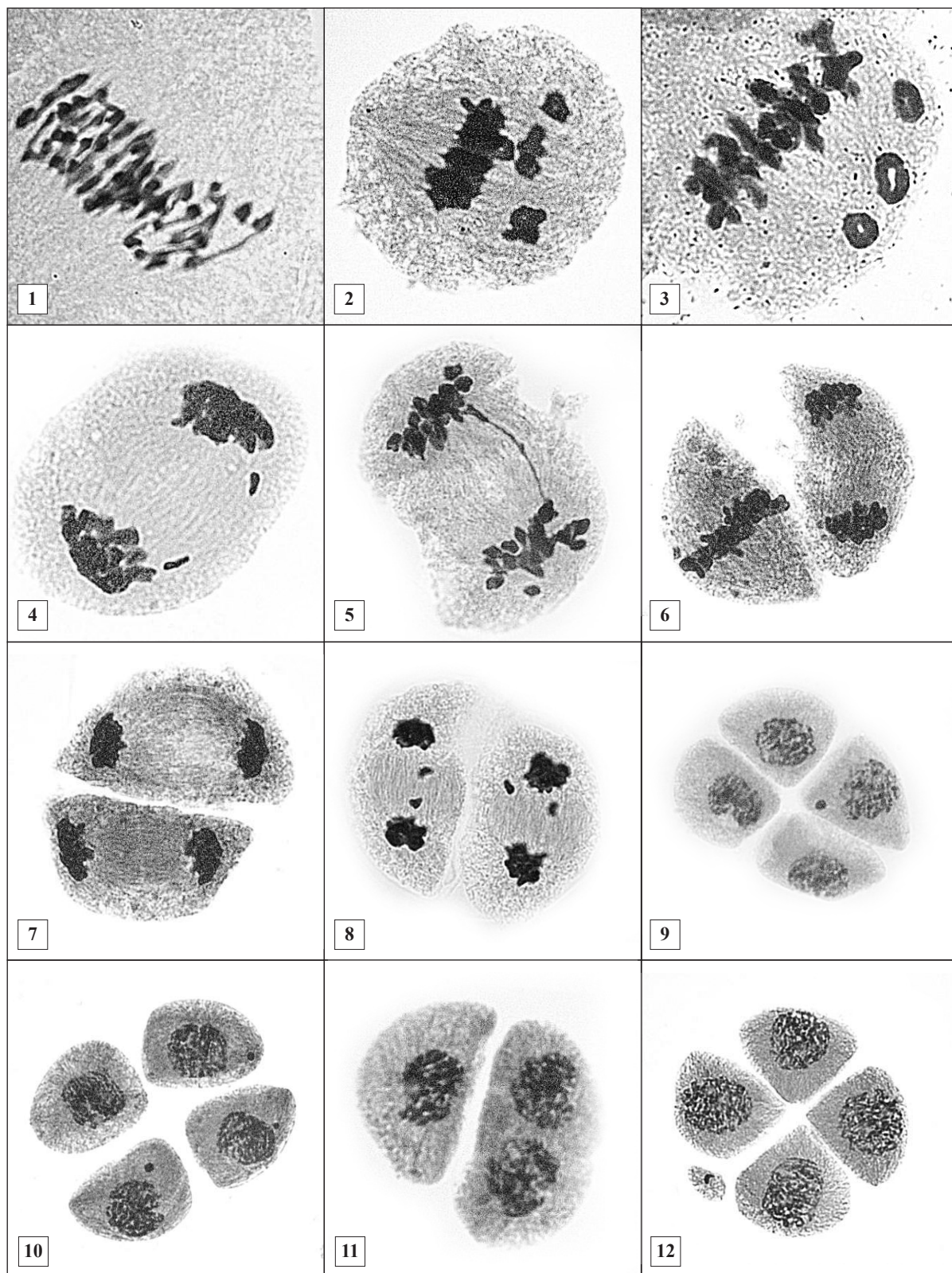
У остальных сортов овса посевного среднее количество материнских клеток пыльцы (МКП) с нарушениями было незначительным и колебалось от 0,14% у сорта Бинго до 0,81% у сорта Айвори. У всех проанализированных сортов наблюдалось явное преобладание закрытых бивалентов над открытыми, что свидетельствует о высокой интенсивности процесса синапсиса гомологичных хромосом. В то же время у всех сортов, кроме Айвори, было отмечено определенное количество МКП с бивалентами, не входящими в состав метафазной пластинки (рис. 2.2, 2.3), что согласуется с литературными данными [4, 5] и, по-видимому, является характерной особенностью мейотического цикла у представителей рода *Avena* L.

Если исходить из положения, что образующиеся в метафазе I униваленты являются основной причиной аномалий на последующих стадиях мейоза, то на стадии анафазы I у сортов овса следует ожидать незначительного количества нарушений. Проведенный анализ этой стадии в целом подтвердил ожидания – количество МКП с нарушениями колебалось от 15 до 38,3%. Исключение составил сорт Фристайл, у которого количество МКП без нарушений при переходе к стадии AI снизилось от 100 до 25% (табл. 4). При этом основной тип аномалий заключался в отставании от основных анафазных групп деления двух (41,6% МКП; рис. 2.4), реже – одной (25% МКП) хромосом.

**Таблица 3**

Средние частоты различных хромосомных ассоциаций на МКП в метафазе I мейоза сортов овса посевного

Сорт	Биваленты				Униваленты
	Закрытые	Открытые	Всего	%	
Айвори	20,13±0,19	0,70±0,16	20,83±0,10	99,19	0,33±0,19
Бинго	20,03±0,19	0,93±0,19	20,97±0,03	99,86	0,06±0,06
Запавет	20,07±0,19	0,93±0,19	21,00±0,00	100,00	0
Лидия	20,50±0,15	0,43±0,14	20,93±0,05	99,67	0,14±0,09
Мирт	20,13±0,15	0,77±0,15	20,09±0,06	99,50	0,20±0,11
Фристайл	20,37±0,15	0,63±0,15	21,00±0,00	100,00	0



**Рис. 2.** Материнские клетки пыльцы сортов овса посевного *Avena sativa* L: 1 – МКП в метафазе I мейоза без нарушений; 2, 3 – МКП в метафазе I мейоза с не включенными в метафазную пластинку бивалентами; 4 – МКП с двумя отставшими хромосомами; 5 – МКП с мостами; 6 – асинхронное деление в метафазе II мейоза; 7 – МКП в анафазе II мейоза без нарушений; 8 – МКП в анафазе II мейоза с отставшими хромосомами; 9, 10 – тетрады с одним и тремя микроядрами; 11 – триада; 12 – пентада.

Таблица 4

## Характеристика стадии анафаза I мейоза у сортов овса посевного

Сорт	Количество МКП без нарушений, %	Количество МКП с нарушениями		
		С числом отставших хромосом, %		С мостами, %
		1	2	
Айвори	61,67	–	1,66	36,70
Бинго	78,57	–	–	21,43
Запавет	85,00	–	5,00	10,00
Лидия	75,71	–	1,43	22,86
Мирт	77,14	7,14	–	15,72
Фристайл	25,00	25,00	41,67	8,33

Следует отметить, что для сорта Фристайл характерны также существенные различия по уровню цитологической стабильности между индивидуальными растениями. Что касается других исследованных сортов, то количество МКП с отставшими хромосомами у них было незначительным (от 1,43 до 7,14%, а у сорта Бинго такой тип нарушения мейоза не был выявлен вообще), в то время как основной аномалией анафазного расхождения было формирование мостов (рис. 2.5). Наибольшее количество МКП с мостами (36,7%) было отмечено у сорта Айвори, наименьшее (8,33%) – у сорта Фристайл. Появление этого типа аномалий обычно связывают с запоздалой терминализацией хиазм [6].

На стадии метафаза II размах изменчивости по количеству МКП без нарушений существенно снизился (табл. 5), а количество МКП с нарушениями не превышало 26%.

Худший показатель был отмечен у сорта Фристайл, однако он был на 48% меньше, чем на предыдущей стадии, что говорит о существенной нормализации процесса мейоза с переходом ко второму делению. Основными нарушениями являлись наличие 1–3 унивалентных хромосом, при этом максимальное их число (3) отмечено только у сорта Фристайл (1,25% МКП), а также асинхронность деления (рис. 2.6).

На следующей стадии мейоза – в анафазе II количество МКП без нарушений у большинства сортов осталось на прежнем уровне с небольшими колебаниями (2–4%) как в сторону уменьшения, так и увеличения показателя. Исключение составляют сорта Бинго и Мирт. У первого произошло существенное (на 12,75%) улучшение показателя, в то время как у второго количество МКП без нарушений снизилось на 12,12% (табл. 6). Количество МКП с отставшими хромосомами было не-

Таблица 5

## Характеристика стадии метафаза II мейоза у сортов овса посевного

Сорт	Количество МКП без нарушений, %	Количество МКП с нарушениями			
		С числом унивалентов, %			С асинхронным делением, %
		1	2	3	
Айвори	84,29	5,71	4,29	–	5,71
Бинго	81,25	13,75	3,75	–	1,25
Запавет	84,28	2,86	2,86	–	10,00
Лидия	78,00	6,00	–	–	16,0
Мирт	86,67	6,67	3,33	–	3,33
Фристайл	73,75	8,75	12,50	1,25	3,75

значительным, за исключением сорта Мирт, у которого выявлено 5,45% МКП с одной отставшей хромосомой и 10,91% – с двумя (рис. 2.8). У двух сортов (Айвори и Лидия) наблюдались МКП с мостами. Основной аномалией на этой стадии являлось асинхронное деление, которое было отмечено у всех исследованных сортов, при этом количество МКП с этим видом нарушений варьировало от 2,0 до 13,75%.

Стадия тетрад является заключительной, и количество МКП без аномалий на этой стадии (мейотический индекс) является важным показателем нормального течения всего мейоза. Как видно из данных табл. 7, все исследованные сорта, за исключением сорта Фристайл, характеризуются высоким значением мейотического индекса. У сортов Бинго и Лидия тетрад с аномалиями не выявлено. У сорта Мирт 1,25% тетрад содержали по два микроядра, у сорта Запавет с одинаковой частотой (1,25%) встречались тетрады с 1, 2 и 3-мя микроядрами (рис. 2.9, 2.10).

Наибольшее количество тетрад с микроядрами (24,17% с одним микроядром и 16,67% – с двумя) было выявлено у сорта Фристайл. Среди других свойственных данной стадии мейоза аномалий в незначительном количестве были выявлены триады (1% – у сорта Айвори) и пентады (1,25% – у сорта Запавет) (рис. 2.11, 2.12)

В целом, следует отметить высокую цитологическую стабильность подавляющего большинства исследованных сортов овса посевного. Сравнение в дальнейшем полученных данных с аналогичными данными для гибридных форм овса позволит выделить наиболее перспективные для включения в селекционный процесс генотипы.

#### *Анализ генетического полиморфизма сортов A. sativa*

Генетический полиморфизм сортов овса посевного, включенных в исследование, был изучен с использованием микросателлитных (SSR) маркеров. Данные об аллельном составе изученных локусов представлены в табл. 8.

**Таблица 6**

Характеристика стадии анафаза II мейоза у сортов овса посевного

Сорт	Количество МКП без нарушений, %	Количество МКП с нарушениями			
		С числом отставших хромосом, %		С мостами, %	С асинхронным делением, %
		1	2		
Айвори	80,00	3,33	–	10,00	6,67
Бинго	94,00	4,00	–	–	2,00
Запавет	82,50	2,50	1,25	–	13,75
Лидия	80,00	–	–	11,67	8,33
Мирт	74,55	5,45	10,91	–	9,09
Фристайл	75,00	1,67	1,67	–	13,75

**Таблица 7**

Характеристика стадии тетрад в мейозе сортов овса посевного

Сорт	Мейотический индекс, %	Количество тетрад с микроядрами, %			Триады, %	Пентады, %
		1	2	3		
Айвори	99,00	–	–	–	1,00	–
Бинго	100,00	–	–	–	–	–
Запавет	95,10	1,25	1,25	1,25	–	1,25
Лидия	100,00	–	–	–	–	–
Мирт	98,75	–	1,25	–	–	–
Фристайл	55,00	24,17	16,67	–	–	–

Таблица 8

Результаты фрагментного анализа продуктов ПЦР с праймерами к микросателлитным локусам овса посевного

Сорт, образец	AM1, п.о.	AM3, п.о.	AM4, п.о.	AM5, п.о.	AM7, п.о.	AM15, п.о.
Мирт	156	300	133, 139	134	153	225, 228
Запавет	156	260	135	134	153, 155	225
Фристайл	156	288	133	131	155	225
Лидия	156	288	133	131	155	225
Айвори	151	284	138	131	155	227
Бинго	153	–	133	131	155	223

В ходе исследования выявлено, что количество аллелей на исследованный локус колеблется от 2 до 4. Сорта белорусской селекции Фристайл и Лидия мономорфны по всем шести исследованным локусам. Сорта Мирт и Запавет имеют аналогичный им аллельный состав по локусу AM1, но отличаются по составу других локусов. Сорт немецкой селекции Айвори отличается от сортов белорусской селекции по аллельному составу локусов AM1, AM3, AM4, M15, а сорт польской селекции Бинго – по составу локусов AM1 и AM15. Большинство сортов характеризуются одновариантным составом микросателлитных локусов. Для сорта Мирт выявлены по 2 варианта микросателлитных локусов AM4 и AM15. Сорт Запавет несет 2 варианта локуса AM7.

Оценка устойчивости к болезням образцов *A. sterilis* L.

Проведена оценка включенных в исследование форм *A. sterilis* L. по устойчивости к корончатой и стеблевой ржавчине в условиях естественного инфекционного фона. Погодные условия 2016 года в целом были депрессивными для проявления корончатой ржавчины овса. Первые признаки болезни появились к моменту уборки образцов на вторичных побегах кушения. Устойчивость к корончатой ржавчине показали образцы EN 2145, С.І. 8387, PI 287211, F 169, F 290, С.І. 8081, CW 486 (табл. 9). Стандартный сорт овса Запавет проявил умеренную восприимчивость. Статистическая обработка полученных данных выявила существенные различия по степени устойчивости изученных образцов и сорта стандарта. Заражение стеблевой ржавчиной в посевах *A. sterilis* L. в 2016 году не наблюдалось.

Таблица 9

Устойчивость образцов *A. sterilis* L. к корончатой ржавчине

№	Каталог ВИР	Название	Степень устойчивости к корончатой ржавчине, балл
1	1870	CW 486	7
2	1876	С.І. 8081	7
3	1877	С.І. 8387	7
4	1888	PI 287211	7
5	1970	ME 1951	5
6	1977	EN 2145	7
7	1978	F 033	5
8	1981	F 169	7
9	1982	F 290	7
10	655	CAV 1975	5

## Окончание табл. 9

№	Каталог ВИР	Название	Степень устойчивости к корончатой ржавчине, балл
11	517	CAV 1360	5
12	539	CAV 1414	3
13	428	ME 1083	5
14	Запавет (стандарт)		3
НСР <sub>05</sub>			1,9

### Заключение

Выявлены особенности морфологии включенных в гибридизацию образцов *Avena sterilis* L. по сравнению с сортами *Avena sativa* L. Показана высокая цитологическая стабильность (мейотический индекс 95,10–100%) подавляющего большинства проанализированных сортов овса посевного. Сорт белорусской селекции Фристайл отличался низким уровнем общей цитологической стабильности (мейотический индекс – 55,00%) и существенными различиями по уровню цитологической стабильности между индивидуальными растениями на отдельных стадиях мейоза. С использованием SSR-маркеров изучен генетический полиморфизм сортов *Avena sativa* L. на молекулярном уровне. Проведен анализ устойчивости к стеблевой и корончатой ржавчине образцов *A. sterilis* различного географического происхождения в условиях Беларуси. Установлено, что образцы EN 2145, С.І. 8387, PI 287211, F 169, F 290, С.І. 8081, CW 486 характеризуются высокой устойчивостью к болезням и достоверно превосходят по этому показателю сорт-стандарт Запавет. Полученные данные будут использованы в дальнейшей работе для отбора наиболее перспективных

для селекционной проработки гибридных генотипов.

### Список использованных источников

1. Скоро сеять овес [Электронный ресурс] / С.П. Халецкий [и др.]. – Режим доступа: [izis.by/wp-content/uploads/articles/skoro-seyat-oves.doc](http://izis.by/wp-content/uploads/articles/skoro-seyat-oves.doc).
2. Лоскутов, И.Г. Дикорастущие виды овса – источник ценных для селекции генов / И.Г. Лоскутов. – СПб: ВИР, 2005. – С. 823–830.
3. Паушева, З.П. Практикум по цитологии растений / З.П. Паушева. – М.: Колос, 1970. – 254 с.
4. Baptista-Giacomelli, F.R. Elimination of micronuclei from microspores in a Brazilian oat (*Avena sativa* L.) variety / F.R. Baptista-Giacomelli, M.S. Pagliarini, J.L. de Almeida // Genet. Mol. Biol. – 2000. – Vol. 23, № 3. – P. 681–684.
5. Suaki, R.M. Microsporogenesis in Brazilian varieties of *Avena sativa* and *Avena strigosa* under agronomic forage selection / R.M. Suaki [et al.] // Cytologia. – 2003. – Vol. 68, № 3. – P. 295–302.
6. Цитология и генетика мейоза / отв. ред. В.В. Хвостова, Ю.Ф. Богданов. – М.: Наука, 1975. – 432 с.



N.I. Dubovets<sup>1</sup>, Y.A. Sycheva<sup>1</sup>, N.I. Drobot<sup>1</sup>, Y.B. Bondarevich<sup>1</sup>, L.A. Solovey<sup>1</sup>, S.P. Khaletsky<sup>2</sup>

**CHARACTERISTIC OF THE INITIAL MATERIAL  
BY A COMPLEX OF TRAITS FOR USE IN OAT (*AVENA SATIVA* L.)  
BREEDING BY THE METHOD OF DISTANT HYBRIDIZATION**

<sup>1</sup>Institute of Genetics and Cytology, NAS of Belarus  
Minsk BY-220072, the Republic of Belarus

<sup>2</sup>Research and Practical Center of National Academy of Sciences of the Republic of Belarus  
for Arable Farming  
Zhodino, BY-222160, the Republic of Belarus

Results of the initial parental forms' assessment (varieties *Avena sativa* L. and *Avena sterilis* L. specimens) by a number of traits that are supposed to be used in future work to verify the hybrid nature of the developed material and to select the most promising in further breeding genotypes are presented. Data on the morphological traits of *Avena sterilis* L. specimens and their resistance to stem and crown rust given. The cytological stability and genetic polymorphism by SSR-markers of *Avena sativa* L. varieties studied.

**Key words:** *Avena sativa* L., *Avena sterilis* L., cross-species hybridization, diseases resistance, cytological stability, SSR markers.

*Дата поступления статьи: 14 сентября 2017 г.*

М.Н. Шаптуренко<sup>1</sup>, Т.В. Печковская<sup>1</sup>, А.В. Якимович<sup>2</sup>, Ю.М. Забара<sup>2</sup>, С.И. Вакула<sup>1</sup>, Л.В. Хотылева<sup>1</sup>

## ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИВЕРГЕНЦИЯ И ЕЕ РОЛЬ В РЕАЛИЗАЦИИ ГЕТЕРОТИЧЕСКОГО ПОТЕНЦИАЛА КАПУСТЫ БЕЛОКОЧАННОЙ (*BRASSICA OLERACEA* L.)

<sup>1</sup>Институт генетики и цитологии НАН Беларуси  
Республика Беларусь, 220072, г. Минск, ул. Академическая, 27  
e-mail: m.shapturenko@igc.by

<sup>2</sup>РУП «Институт овощеводства»  
Республика Беларусь, 223013, Минский р-н, п. Самохваловичи, ул. Ковалева, 2

При изучении роли молекулярно-генетической дивергенции исходного материала в формировании гетерозиготного преимущества гибридов  $F_1$  выполнен скрининг аллельного состава микросателлитных локусов капусты белокочанной. Проведен генетический анализ линий и гибридов, полученных по схеме полного диаллельного скрещивания. В результате показано, что общая и локус-специфическая гетерозиготность имеют важное значение при формировании гетеротического ответа в  $F_1$ , и оценка молекулярно-генетического полиморфизма может быть дополнительным критерием отбора при планировании скрещиваний в селекции капусты белокочанной на гетерозис.

**Ключевые слова:** гетерозис, SSR-полиморфизм, капуста белокочанная, гибриды  $F_1$ .

### Введение

В мировом овощеводстве капуста белокочанная *Brassica oleracea* L. var. *capitata* L. f. *alba* DC. (геном CC,  $2n = 18$ ) занимает важное место как ценный источник питательных и биологически активных компонентов [1]. Селекционный процесс капусты белокочанной, как и многих овощных культур, направлен на создание гетерозисных гибридов. При этом перед селекционером стоит задача проведения эффективного отбора и идентификации родительских компонентов межлинейной комбинации с высоким генетическим потенциалом.

Традиционно отбор исходного материала для селекции основан на данных полевого испытания. При этом учитываются основные фенотипические показатели, позволяющие выделять образцы, выровненные по срокам созревания, размеру и форме кочана. Тем не менее, генетическая компонента изменчивости, обусловленная гетерозиготностью генотипов по разным аллелям, как правило, остается за пределами такой оценки. Следовательно, возможности отбора, так же, как и контроль типичности наследуемого в поколениях генетического материала, в значительной мере ограничены.

Доступные к настоящему времени методические подходы к анализу вариабельности ДНК

способны облегчить создание генетически однородных форм за счет отбора индивидуальных растений с установленным профилем амплифицированных ДНК фрагментов, а также обеспечить подбор дивергентного материала для скрещиваний в селекции на гетерозис [2, 3].

Удобным и технологичным методом ДНК-скрининга является микросателлитный (SSR, Simple Sequence Repeat) анализ, который эффективно используется для картирования, выявления сцепления и закономерностей наследования. Микросателлиты относятся к tandemно повторяющимся последовательностям ДНК, которые широко представлены в геноме растений и животных, включая кодирующие и некодирующие области [4, 5]. У растений SSR-последовательности предпочтительно связаны с нетранслируемыми областями транскрибируемых регионов [6]. До недавнего времени микросателлиты рассматривались как элементы, возникающие в результате ошибок репликации и не несущие существенной генетической информации [7]. С развитием геномики накоплено достаточно доказательств, подтверждающих генетические и фенотипические эффекты tandemных повторов, которые проявляют различные свойства в геномных областях с разной функциональностью [8, 9].

Микросателлитные маркеры выявляют большое разнообразие аллелей для отдельного локуса, поскольку события, обуславливающие вариацию в количестве повторов, являются частыми и обратимыми [10]. В некоторых случаях отмечается существование более 10 аллелей для одного маркера [11]. Эта информация может быть полезна, так как она обеспечивает эффективный способ отслеживания аллелей в популяции и позволяет дифференцировать генотипы при использовании относительно небольшого числа маркеров.

С целью поиска и разработки тестов, позволяющих повысить эффективность отбора ценного исходного материала  $F_1$  капусты белокочанной в селекции на гетерозис, нами были рассмотрены перспективы использования оценки генетической дивергенции исходных родительских форм, основанной на скрининге SSR-полиморфизма ДНК, в качестве критерия отбора компонентов гибридизации.

### Материалы и методы

Объектом исследования служили селекционные линии капусты белокочанной (L141, L241, L341, L671, Upt1, Upt6, Apt1, tr6) различного эколого-географического происхождения, а также их гибриды  $F_1$ .

Гибридизацию проводили по схеме полного диаллельного скрещивания  $8 \times 8$ . Полевые испытания выполняли в открытом грунте на селекционном участке РУП «Институт овощеводства» в трехкратной повторности при рандомизированном размещении растений в соответствии с агротехническими требованиями.

Для анализа фенотипических признаков использовали многофакторный дисперсионный анализ по модели R.E. Comstock & H.F. Robinson [12], согласно которой, общая фенотипическая вариация между гибридами была разделена на генотипическую и средовую, а генотипическая вариация, в свою очередь, разделена на составляющие ее компоненты, зависящие от комбинационной ценности материнских и отцовских линий.

Относительный гипотетический гетерозис (ГГ) рассчитывали как превышение  $F_1$  над средней величиной обеих родительских линий, истинный (ИГ) – как превышение  $F_1$  над лучшим родителем. Если показатель гибрида  $F_1$  оказывался хуже худшего родителя, гетерозис

считали как отклонение гибрида от худшего родителя. В этом случае величина истинного гетерозиса была отрицательной.

Для молекулярно-генетического анализа ДНК выделяли из этиолированных проростков в трехкратной повторности при помощи набора реагентов Genomic DNA Purification Kit (#K0512, Fermentas) согласно инструкции. Каждая повторность представлена материалом, полученным из 3–9 индивидуальных растений. Препараты ДНК разводили до конечной концентрации  $10 \text{ ng/ml}^{-1}$  в деионизированной воде и хранили при температуре  $+4^\circ\text{C}$ .

Для оценки аллельного состава микросателлитных локусов использовали маркеры, разработанные на основе экспрессирующихся последовательностей (EST) [13, 14] для межвидовой дифференциации представителей рода *Brassica*. Амплификацию проводили на оборудовании Biometra (Германия) в стандартном режиме.

Анализ флуоресцентно-меченых SSR-фрагментов выполнен на автоматическом секвенаторе Applied Biosystems Genetic Analyzer 3500 (США). Размер продуктов амплификации определяли с применением стандарта молекулярного веса S450 (Синтол, Россия). Полученные данные анализировали при помощи пакета прикладных программ GeneMapper 4.1.

Оценку аллельного состава SSR-локусов осуществляли на основе бинарных матриц. Расчет генетических расстояний и кластеризацию экспериментального материала методом UPGMA выполняли с использованием программы DARwin 5.0 (v. 1.3b). Анализ частот SSR-локусов и информационного содержания соответствующих маркеров выполнен при помощи приложения GenAlEx 6.5 [15]

### Результаты и обсуждение

#### *Аллельный состав и генетическая вариация SSR-локусов*

При проведении микросателлитного анализа ДНК-полиморфизма линий капусты белокочанной рассмотрено 52 аллельных варианта 15 SSR-локусов. На один детектируемый SSR-локус приходилось от 1 до 7 аллелей, что в среднем составило 3,5 аллеля на локус. Все использованные маркеры, за исключением BoTHL1 и BoPLD2, выявляли полиморфизм в соответствующих точках ДНК (табл. 1).

Таблица 1

## Характеристика SSR-маркеров для идентификации межлинейного полиморфизма

Локус	PIC	Аллели	Частоты аллелей, %	Локус	PIC	Аллели	Частоты аллелей, %
BoAB20TR	0,37	168	18,75	BoTHL1	0,0	149	100,0
		193	12,50	BoDCTD1	0,54	132	6,25
		196	68,75			147	6,25
		315	75,00			152	25,00
		339	25,00			166	58,33
		169	4,17				
BoPC15	0,53	153	6,25	BoPC34	0,47	94	12,50
		163	43,75			128	4,17
		169	6,25			133	16,67
		176	43,75			135	66,67
BoIAB15TR	0,39	140	14,58	BoCalc	0,75	102	12,50
		239	12,50			106	6,25
		302	72,92			112	37,50
BoPLD2	0,0	188	100,00	BoCala	0,72	126	12,50
BoABI1	0,04	160	2,08			175	6,25
		166	97,92			183	18,75
BoRem1b	0,63	153	6,25	BoCala	0,72	215	6,25
		156	29,17			210	18,75
		159	25,00			220	18,75
		163	39,58			225	22,92
BoPLD1	0,78	199	12,50	BoDEL9	0,24	242	33,33
		204	6,25			245	6,25
		207	16,67			252	16,67
		220	8,33	BoAP1	0,3	262	83,33
		248	6,25			141	75,00
		267	18,75			147	25,00
		276	31,25				

Примечание. PIC – коэффициент информативности маркера

Наиболее информативным (PIC > 0,7) для оценки межлинейного полиморфизма оказалось использование маркеров BoPLD1, BoCalc, BoCala, для которых рассмотрено 7, 7 и 5 аллельных вариантов соответственно и выявлено наибольшее число эффективных аллелей (Ne). Среди проанализированных аллелей 41% полиморфны, что позволило дифференцировать генотипы по уникальным SSR-наборам. Редкие варианты аллелей (частота встречаемости ≤ 6,25) выявлены при использовании 8 маркеров, четыре из которых (BoPC15, BoPLD1, BoDCTD1,

BoCalc) обнаруживали по 2–3 уникальных аллеля на локус. Перечисленные маркеры могут использоваться для паспортизации и идентификации генотипов капусты белокочанной.

Дисперсионный анализ подтвердил достоверность выявленных различий между линиями, из которых 91% соотносится с межлинейной и 9% с внутрелинейной вариацией экспериментальных форм.

Для оценки генетических взаимоотношений экспериментальных образцов были рассчитаны генетические расстояния и выполнен кла-

стерный анализ методом UPGMA (рис. 1). Величина генетических расстояний варьировала в диапазоне 0,38–0,72. Анализируемые линии распределились по двум субкластерам с одной внешней ветвью. В первый субкластер вошли линии Upt1, Upt6, L141, Apt3; во второй – Tr6, L241, L341. Внешнюю ветвь образовала линия L671, генотип которой выявил наибольшее число уникальных SSR-локусов.

#### Генетический анализ линий и гибридов $F_1$

Оценка семенного поколения линий капусты белокочанной показала, что начало цветения растений наступает в конце мая – начале июня и по срокам массового цветения позволяет осуществлять гибридизацию в коммерческих целях. Среднее количество завязавшихся семян при самоопылении в результате изоляции цветков не превышает 0,4 шт. на стручок, при гейтоногамном опылении (при переносе пыльцы с цветка на цветок в пределах одного растения) колеблется от 9 до 22,7 шт. на стручок, в зависимости от генотипа. Высокий уровень самонесовместимости характерен для линий L141, L341 и Tr6.

Изучаемые линии имеют различия по высоте растения и типу куста семенного растения. Наименьшей высотой характеризовались линии L341 и L671, тогда как наиболее высокорослыми были L141 и Tr6.

Испытание 76 диаллельных гибридов капусты белокочанной включало анализ следующих основных фенотипических показателей: «средняя масса кочана» (МК), «диаметр кочана» (ДК), «высота кочана» (ВК), «высота внутренней кочерыги» (ВВК), по которым оценивался уровень проявления гетерозиса. Исследования показали, что все гибриды проявляют гетерозис, однако его степень варьирует в зависимости от комбинации скрещивания (табл. 2).

Поскольку основным хозяйственно ценным признаком при селекции капусты белокочанной является урожайность, которая определяется массой кочана, оценка родительских линии по потомству основывалась, в первую очередь, на анализе данного признака. Величина гетерозиса варьировала в зависимости от комбинации скрещивания. Значения гипотетического гетерозиса > 100% для признака «масса кочана» отмечены у 22 гибридов, истинного – у 14. При этом во всех случаях (за исключением гибридов Tr6 × Upt6) одним из компонентов гибридизации выступали линии L341 и L641, которые характеризовались наибольшей общей комбинационной способностью по данному признаку. Гибрид L341 × 641 имел один из лучших показателей средней массы кочана (> 3 кг) и при этом превосходил среднюю родителей на 209,8% и лучшего из родителей – на 157%.

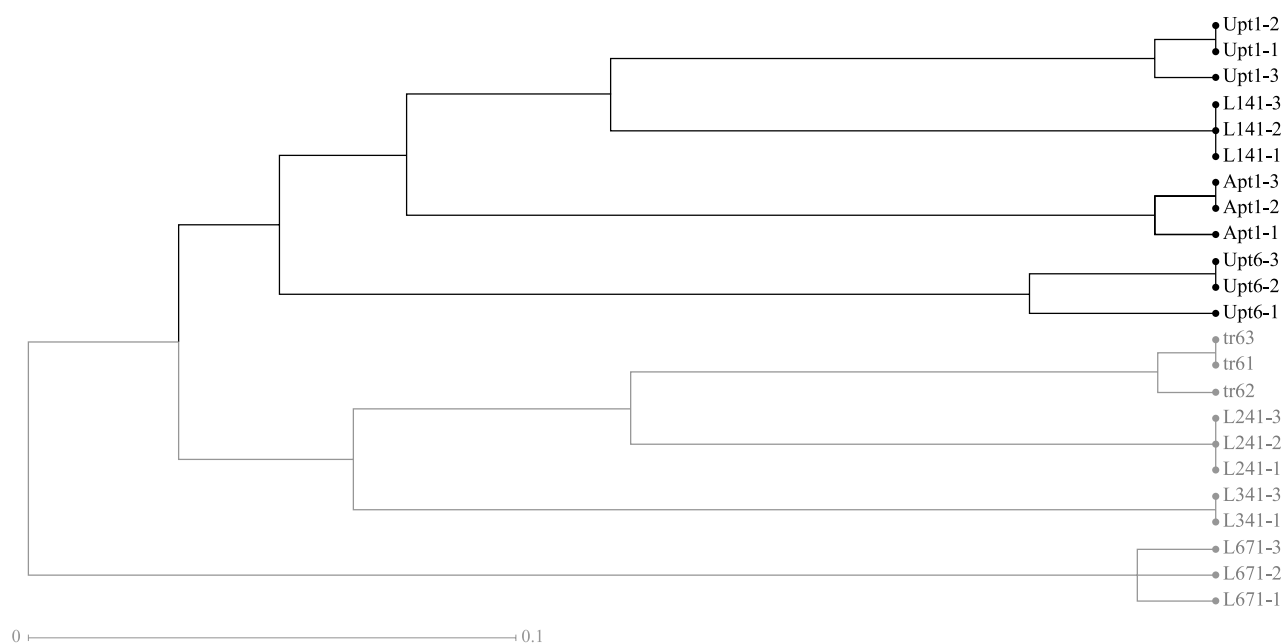


Рис. 1. Генетическая дифференциация селекционных линий капусты белокочанной, выполненная на основе данных SSR-скрининга

Таблица 2

Характеристика гибридов F<sub>1</sub> и их родительских линий по основным селекционным показателям

Генотип (♀×♂)	GD	Диф. полиморфизм (количество локусов)				Среднее значение признака							Гипотетический гетерозис, %					Истинный гетерозис, %				
		П	Н	П/Н	МК, кг	ДК, см	ВК, см	ВВК, см	МК	ДК	ВК	ВВК	МК	ДК	ВК	ВВК	МК	ДК	ВК	ВВК		
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20			
L141×L241	0,531	13	19	0,68	1,736	15,5	18	10	9,5*	14,8*	22,0*	17,6*	9,5*	14,8*	22,0*	17,6*	9,5*	14,8*	22,0*			
L141×L341	0,643	22	14	1,57	2,393	14	14	9,5	74,8**	9,8*	0,0	46,2**	24,6*	7,7*	0,0	18,8*	24,6*	7,7*	0,0			
L141×L641	0,609	18	17	1,06	2,592	14,5	14,5	9	64,1**	3,6	0,0	24,1*	35,0**	-3,3	-3,3	12,5*	35,0**	-3,3	-3,3			
L141×Tr6	0,511	15	14	1,07	1,551	15	19	12	-18,9*	-3,2	28,8**	41,2**	-19,2*	-16,7*	22,6*	33,3*	-19,2*	-16,7*	22,6*			
L141×Upt6	0,517	16	18	0,89	2,209	17	19	9	31,3*	25,9*	28,8**	5,9*	15,1*	21,4*	22,6*	0,0	15,1*	21,4*	22,6*			
L141×Upt1	0,385	19	15	1,27	2,206	18	17	8	40,0**	33,3**	25,9*	10,3*	14,9*	28,6*	21,4*	0,0	14,9*	28,6*	21,4*			
L141×Arr1	0,481	14	19	0,74	2,283	16,5	19	11	46,0**	22,2*	31,0**	25,7*	18,9*	17,9*	26,7*	15,8*	18,9*	17,9*	26,7*			
L241×L341	0,515	22	15	1,47	2,273	17,5	18	8	119,6**	32,1**	22,0*	14,3*	81,8**	25,0*	16,1*	-11,1*	81,8**	25,0*	16,1*			
L241×L641	0,661	24	15	1,60	1,477	16,5	15,5	9	18,6*	13,8*	1,6	16,1*	18,2*	10,0*	0,0	0,0	18,2*	10,0*	0,0			
L241×Tr6	0,383	19	13	1,46	2,358	18	18,5	10,5	49,4**	12,5*	19,4*	16,7*	23,8*	0,0	19,4*	16,7*	23,8*	0,0	19,4*			
L241×Upt6	0,61	18	18	1,00	2,22	16,5	20	10	64,7**	17,9*	29,0**	11,1*	54,2**	17,9*	29,0**	11,1*	54,2**	17,9*	29,0**			
L241×Upt1	0,557	20	13	1,54	2,464	17	20	11	98,4**	21,4*	40,4**	41,9**	97,1**	21,4*	29,0**	22,2*	97,1**	21,4*	29,0**			
L241×Arr1	0,574	14	19	0,74	1,587	15	17	8	29,0**	7,1*	11,5*	-13,5*	27,0*	7,1*	9,7*	-15,8*	27,0*	7,1*	9,7*			
L341×L641	0,773	18	17	1,06	3,186	21	18	7,5	209,8**	52,7**	24,1*	30,4**	157,1**	40,0**	20,0*	15,4*	157,1**	40,0**	20,0*			
L341×Tr6	0,495	18	14	1,29	2,912	21	17	10	113,9**	37,7**	15,3*	42,9**	52,9**	16,7*	9,7*	11,1*	52,9**	16,7*	9,7*			
L341×Upt6	0,722	24	14	1,71	2,901	20	18,5	8,5	156,5**	50,9**	25,4*	21,4*	101,5**	42,9**	19,4*	-5,6*	101,5**	42,9**	19,4*			
L341×Upt1	0,669	18	15	1,20	2,669	20	17	6,5	160,4**	50,9**	25,9*	13,0*	116,6**	42,9**	21,4*	0,0	116,6**	42,9**	21,4*			
L341×Arr1	0,686	18	17	1,06	2,651	19	19,5	6,5	161,7**	43,4**	34,5**	-10,3*	119,5**	35,7**	30,0**	-31,6*	119,5**	35,7**	30,0**			
L641×Tr6	0,641	17	15	1,13	2,607	19	18	9	65,8**	15,2*	18,0*	16,1*	36,9**	5,6*	16,1*	0,0	36,9**	5,6*	16,1*			
L641×Upt6	0,688	20	17	1,18	3,095	19	19,5	8	130,7**	31,0**	27,9*	3,2*	114,3**	26,7*	25,8*	-11,1*	114,3**	26,7*	25,8*			
L641×Upt1	0,635	15	17	0,88	2,593	19	17,5	7	109,9**	31,0**	25,0*	7,7*	109,3**	26,7*	16,7*	7,7*	109,3**	26,7*	16,7*			
L641×Arr1	0,652	18	18	1,00	2,917	20	19	6,5	138,4**	37,9**	26,7*	-18,8*	135,4**	33,3**	26,7*	-31,6**	135,4**	33,3**	26,7*			
Tr6×Upt6	0,59	22	12	1,83	3,377	22	18	9,5	101,7**	37,5**	16,1*	5,6*	77,3**	22,2*	16,1*	5,6*	77,3**	22,2*	16,1*			
Tr6×Upt1	0,537	16	14	1,14	2,869	20	18	9	82,9**	25,0*	26,3*	16,1*	50,6**	11,1*	16,1*	0,0	50,6**	11,1*	16,1*			
Tr6×Arr1	0,554	17	15	1,13	2,991	19	19,5	9,5	92,2**	18,8*	27,9*	2,7*	57,0**	5,6*	25,8*	0,0	57,0**	5,6*	25,8*			

Upt6×Upt1	0,543	10	20	0,50	2,578	19,5	17,5	9	92,7**	39,3**	22,8*	16,1*	78,5**	39,3**	12,9*	0,0
Upt6×Aпт1	0,5	12	21	0,57	1,65	17,5	15	7,5	24,4*	25,0*	-1,6	-18,9*	14,3*	25,0*	-3,2	-21,1*
Upt1×Aпт1	0,507	18	16	1,13	2,377	18,5	17,5	7	94,8**	32,1**	25,0*	-12,5*	92,9**	32,1**	16,7*	-26,3*
L241×L141	0,531	13	19	0,68	1,377	13	18	10,5	-13,2*	-3,7	22,0*	23,5*	-28,3*	-7,1*	16,1*	16,7*
L341×L141	0,643	22	14	1,57	2,679	18,5	18	7	95,7**	45,1**	28,6*	7,7*	39,5**	32,1**	28,6*	-12,5*
L341×L241	0,515	22	15	1,47	2,592	18,5	18,5	11	150,4**	39,6**	25,4*	57,1*	107,4**	32,1**	19,4*	22,2*
L641×L141	0,609	18	17	1,06	2,489	18	18,5	7	57,6**	28,6**	27,6*	-3,4	29,6*	20,0*	23,3*	-12,5*
L641×L241	0,661	24	15	1,60	2,564	18	19	7	105,9**	24,1*	24,6*	-9,7*	104,8**	20,0*	22,6*	-22,2*
L641×L341	0,773	18	17	1,06	2,29	19	18	7,5	122,7**	38,2**	24,1*	30,4**	84,8**	26,7*	20,0*	15,4*
Tr6×L141	0,511	15	14	1,07	1,766	16	17	10	-7,7**	3,2	15,3*	17,6*	-8,0*	-11,1*	9,7*	11,1*
Tr6×L241	0,383	19	13	1,46	2,142	17	17	10	35,7**	6,3*	9,7*	11,1*	12,4*	-5,6*	9,7*	11,1*
Tr6×L341	0,495	18	14	1,29	3,578	19	19,5	9	162,8**	24,6*	32,2**	28,6*	87,8**	5,6*	25,8*	0,0
Tr6×L641	0,641	17	15	1,13	3,447	20,5	21,5	8	119,3**	24,2*	41,0**	3,2	80,9**	13,9*	38,7**	-11,1*
Upt6×L141	0,385	16	18	0,89	2,423	17	19,5	10,5	44,1**	25,9*	32,2**	23,5*	26,2*	21,4*	25,8*	16,7*
Upt6×L241	0,61	18	18	1,00	2,093	17	20	11,5	55,3**	21,4*	29,0**	27,8*	44,9**	21,4*	29,0*	27,8*
Upt6×L341	0,722	24	14	1,71	3,107	20	19,5	8	174,7**	50,9**	32,2**	14,3*	115,2**	42,9**	25,8*	-11,1*
Upt6×L641	0,688	20	17	1,18	3,638	22	19,5	7,5	171,2**	51,7**	27,9*	-3,2	151,9**	46,7**	25,8*	-16,7*
Upt6×Tr6	0,59	22	12	1,83	3,669	23	18	10	119,1**	43,8**	16,1*	11,1*	92,6**	27,8*	16,1*	11,1*
Upt1×L141	0,385	19	15	1,27	2,137	-	-	-	35,6**	-	-	-	11,3*	-	-	-
Upt1×L241	0,557	20	13	1,54	1,278	13,5	16,5	7,5	-18,9*	0,0	22,2*	3,4	2,1	-3,6	6,5*	-16,7*
Upt1×L341	0,669	18	15	1,20	2,656	17,5	18	7	159,1**	32,1**	33,3**	21,7*	115,6**	25,0*	28,6*	7,7*
Upt1×L641	0,635	16	14	1,14	3,038	20	18	6,5	145,9**	37,9**	28,6*	0,0	145,2**	33,3**	20,0*	0,0
Upt1×Tr6	0,537	16	14	1,14	2,925	20,5	18	9	86,5**	28,1**	26,3*	16,1*	53,5**	13,9*	16,1*	0,0
Upt1×Upt6	0,543	10	20	0,50	1,66	16,5	15	8	24,1*	17,9*	5,3*	3,2	15,0*	17,9*	-3,2	-11,1*
Aпт1×L141	0,481	14	19	0,74	2,271	17,5	17,5	9	45,2**	29,6**	20,7*	2,9	18,3*	25,0*	16,7*	-5,3*
Aпт1×L241	0,574	14	19	0,74	2,441	18	20,5	11,5	98,5**	28,6**	34,4**	24,3*	95,0**	28,6*	32,3**	21,1*
Aпт1×L341	0,686	18	17	1,06	2,661	18,5	20	8,5	162,7**	39,6**	37,9**	17,2*	120,3**	32,1**	33,3**	-10,5*
Aпт1×L641	0,652	18	18	1,00	3,203	20	19,5	7,5	161,8**	37,9**	30,0**	-6,3*	158,5**	33,3**	30,0**	-21,1*
Aпт1×Tr6	0,554	17	15	1,13	2,293	17,5	17,5	10	47,3**	9,4*	14,8*	8,1*	89,7**	-2,8	12,9*	5,3*
Aпт1×Upt6	0,5	12	21	0,57	2,612	18,5	19	9	97,0**	32,1**	24,6*	-2,7	80,9**	32,1**	22,6*	-5,3*
Aпт1×Upt1	0,507	18	16	1,13	2,108	18	18	9,5	72,8**	28,6**	28,6*	18,8*	71,1**	28,6*	20,0*	0,0

Примечание. \* -  $p < 0,05$ ; \*\* -  $p < 0,01$ ; МК – масса кочана; ДК – диаметр кочана; ВК – высота кочана; ВВК – высота внутренней кочерыги

Уровень гетерозиса 50–100% над средней родителей показали 15 гибридов, над лучшим из родителей – 18 гибридов. Отрицательные значения как истинного так и гипотетического гетерозиса по данному признаку отмечены в 3-х комбинациях скрещивания, все с участием линии L141, которая имела невысокие значения комбинационной ценности, при которых вариантс СКС превосходила вариантсу ОКС, что говорит о возможности получения гетерозисного потомства с ее участием лишь в отдельных комбинациях скрещивания.

По признакам «диаметр кочана» и «высота кочана» гибриды, как правило, превосходили родителей не более чем на 50%. Положительные значения гетерозиса выявлены в большинстве комбинаций скрещивания. Отрицательные значения характерны для гибридов, полученных с участием L141.

В целом, анализ диаллельных гибридов показал, что наиболее перспективными для селекции являются линии L671 и L341, так как их потомство характеризуется выраженным гетерозисным эффектом по целевым признакам, устойчиво наследует укороченную внутреннюю кочерыгу, в отличие от L241 и L141, потомство которых имеет длинную внутреннюю кочерыгу и сравнительно невысокие показатели средней массы кочана.

#### *Сопряженность генетической дивергенции с гетеротическим потенциалом гибридов F<sub>1</sub>*

Основываясь на данных проведенного анализа, которые позволили установить иерархические связи между экспериментальными формами, оценить комбинационную ценность линий и эффект гетерозиса F<sub>1</sub>, мы исследовали перспективы использования SSR-маркеров для предсказания генетического потенциала капусты белокочанной при ее селекции на гетерозис.

Проведенные исследования показали, что уровень общей ДНК-дивергенции, оцененной на основе анализа аллельного состава SSR-локусов достоверно ассоциирован с истинным ( $r = 0,60$ ) и гипотетическим ( $r = 0,59$ ) гетерозисом диаллельных гибридов F<sub>1</sub> по признаку «средняя масса кочана» (рис. 2), а также с абсолютным выражением этого признака ( $r = 0,36$ ). Позитивный вклад дивергенции в реализацию гетерозиса отмечен также для признака «диаметр кочана» ( $r_{IT} = 0,45$ ;  $r_{иг} = 0,44$ ), в то время как для высоты

кочана каких-либо значимых ассоциаций не обнаружено. Выявлена обратно пропорциональная зависимость между величиной GD, абсолютным выражением признака «высота внутренней кочерыги» и величиной проявляемого истинного гетерозиса на уровне  $-0,5$  и  $-0,25$  соответственно. Следует отметить, что селекция по этому признаку ведется в сторону его уменьшения, что позволят получить лучший индекс формы. Также интересен тот факт, что наибольшие значения истинного и гипотетического гетерозиса по продуктивности растения получены в F<sub>1</sub> от комбинаций наиболее дивергентных родителей L341 × L671 (GD = 0,773, табл. 2).

Поскольку наши исследования характера выражения основных селекционно важных признаков в F<sub>1</sub> выявили значимый реципрокный эффект, мы разделили генеральную совокупность на 2 выборки, соответствующие прямым и обратным гибридам и, далее провели корреляционный анализ. Полученные результаты показали, что внутри каждой группы гибридов направление и сила связей между GD и гетерозисом сохраняется с незначительным варьированием. Более тесная сопряженность выявляется у прямых гибридов между уровнем GD и гетерозисом по признаку «средняя масса кочана», в то время как у обратных гибридов корреляции выше для признака «диаметр кочана».

Изучение значения в проявлении гетерозиса дифференциального полиморфизма микросателлитных локусов, выраженного через соотношение полиморфных и мономорфных локусов в парных комбинациях скрещивания, показало, что существует достоверно положительные связи между числом полиморфных локусов и величиной гетерозиса для признаков «масса кочана» и «диаметр кочана». Однако, несмотря на то, что в нашем эксперименте наиболее высокие значения величины гетерозиса в F<sub>1</sub> соответствуют комбинации с наибольшим числом полиморфных локусов (L341 × L641), основная группа гибридов представляет значительный разброс значений, вследствие чего выявленные корреляции характеризуются низким прогностическим потенциалом ( $r < 0,39$ ).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что прогностическая способность оценки дифференциального полиморфизма SSR-локусов ниже, чем обобщенная оценка генетических взаимоотношений, выраженная через GD.



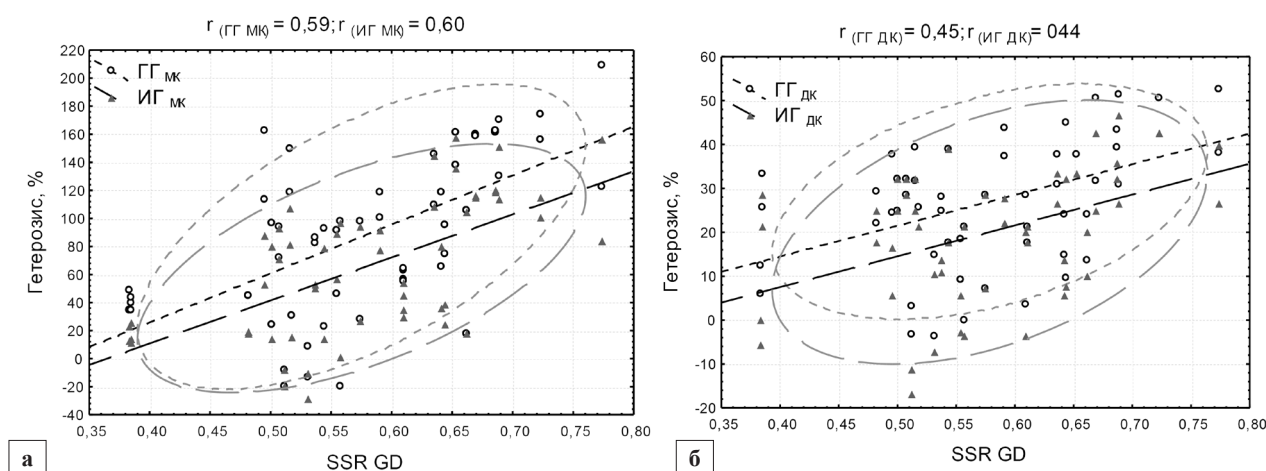


Рис. 2. Распределение варiances в корреляционной решетке при анализе связи SSR GD со степенью проявления гетерозиса в F<sub>1</sub> по признакам: а – средняя масса кочана; б – диаметр кочана

Таблица 3

Анализ сопряженности генетических дистанций и дифференциального полиморфизма ДНК с абсолютными значениями признаков, истинным и гипотетическим гетерозисом гибридов F<sub>1</sub>

Показатель	Абсолютные значения (x <sub>ср</sub> )				Гипотетический гетерозис, %				Истинный гетерозис, %				
	МК, кг	ДК, см	ВК, см	ВВК, см	МК	ДК	ВК	ВВК	МК	ДК	ВК	ВВК	
Все F <sub>1</sub>													
GD	0,36**	0,31**	0,14	-0,50**	0,59**	0,45**	0,15	-0,09	0,60**	0,44**	0,21	-0,25*	
DP	Np	0,34**	0,24*	0,08	-0,14	0,39**	0,29*	0,05	0,15	0,32**	0,18	0,13	-0,09
	Nm	-0,30**	-0,24*	0,02	-0,06	-0,15	0,00	-0,04	-0,30**	-0,07	0,23*	0,00	-0,17
	K	0,34**	0,27*	0,00	-0,03	0,28*	0,18	-0,01	0,22	0,20	0,02	0,03	0,03
Прямые F <sub>1</sub>													
GD	0,38*	0,23	0,00	-0,42**	0,62**	0,36*	-0,02	-0,01	0,63**	0,37*	0,03	-0,17	
DP	Np	0,29	0,13	-0,04	-0,04	0,34*	0,16	-0,08	0,22	0,26	0,08	0,00	0,01
	Nm	-0,33*	-0,24	-0,07	-0,30	-0,16	0,00	-0,10	-0,48**	-0,06	0,22	-0,10	-0,36*
	K	0,32	0,20	-0,02	0,14	0,26	0,11	-0,05	0,35	0,16	-0,03	0,00	0,18
Обратные F <sub>1</sub>													
GD	0,34*	0,39*	0,30	-0,58**	0,57**	0,54**	0,40*	-0,17	0,58**	0,51**	0,42**	-0,34*	
DP	Np	0,39*	0,36*	0,23	-0,23	0,44	0,41*	0,23	0,06	0,38*	0,28	0,27	-0,20
	Nm	-0,27	-0,24	0,14	0,17	-0,14	-0,01	0,05	-0,08	-0,09	0,23	0,10	0,05
	K	0,36*	0,33*	0,03	-0,21	0,31	0,26	0,05	0,05	0,25	0,07	0,06	-0,15

Примечание. GD – генетическая дивергенция; DP – дифференциальный полиморфизм; Np – число полиморфных локусов; Nm – число мономорфных локусов; K – коэффициент соотношения числа полиморфных локусов к числу мономорфных локусов

### Заключение

Исследования, выполненные на капусте белокочанной с использованием микросателлитных маркеров, свидетельствуют о том, что использование данных об общем полиморфизме оказывает положительное влияние при выбо-

ре гетеротических комбинаций скрещивания, но при этом не может служить единственным критерием отбора из-за недостаточно высокой прогностической способности. С одной стороны, *B. oleracea* обладает высокой степенью внутривидового полиморфизма, благодаря

биологическим особенностям, который представляет значимый генетический потенциал для селекции, с другой, только часть выявляемой у этой культуры гетерогенности ассоциирована с гетерозисом F<sub>1</sub>. Вероятно, наибольшее значение оказывает гетерозиготность отдельных локусов, которые обнаруживают сцепление с целевыми признаками или регулируют биохимические пути, опосредующие их оптимальное выражение.

#### Список использованных источников

1. Current Trends in Cabbage Breeding / Zh. Fang [et al.] // Journal of New Seeds. – 2005. – Vol. 6 (2–3). – P. 75–107.
2. Информативные EST-SSR маркеры для типирования и внутривидовой дифференциации *Brassica oleracea* var. *Capitata* L. / М.Н. Шаптуренко [и др.] // Вавил. журн. генетики и селекции. – 2016. – Т. 20. № 1. – С. 51–56.
3. Шаптуренко, М.Н. Гетерозис: современные тенденции в изучении молекулярных механизмов / М.Н. Шаптуренко, Л.В. Хотылева // Вавил. журн. генетики и селекции. – 2016. – Т. 20. № 5. – С. 683–694.
4. Preference of simple sequence repeats in coding and non-coding regions of *Arabidopsis thaliana* / L. Zhang [et al.] // Bioinformatics. – 2004. – Vol. 20 (7). – P. 1081–1086.
5. Methods for Development of Microsatellite Markers: An Overview / S. Senan [et al.] // Not. Sci. Biol. – 2014. – Vol. 6 (1). – P. 1–13.
6. Microsatellites are preferentially associated with nonrepetitive DNA in plant genomes / M. Morgante, M. Hanafey, W. Powell // Nature Genetics. – 2002. – Vol. 30. – P. 194–200.
7. Bhargava A. Mutational Dynamics of Microsatellites / A. Bhargava, F.F. Fuentes // Mol. Biotechnol. – 2010. – Vol. 44 (3). – P. 250–266.
8. Katti, M.V. Differential distribution of simple sequence repeats in eukaryotic genome sequences / M.V. Katti, P.K. Ranjekar, V.S. Gupta // Molecular Biology and Evolution. – 2001. – Vol. 18. – P. 1161–1167.
9. Kapil, A. ChloroSSRdb: a repository of perfect and imperfect chloroplast simple sequence repeats (cpSSRs) of green plants. Database / A. Kapil, P.K. Rai, A. Shanker // Online Journal of Biological Databases and Curation. – 2014. – DOI: 10.1093/database/bau107.
10. Kashi, Y. Simple sequence repeats as advantageous mutators in evolution / Y. Kashi, D.G. King // Trends Genet. – 2006. – Vol. 22. – P. 253–259.
11. Grouping of accessions of Mexican races of maize revisited with SSR markers / J.C. Reif [et al.] // Theor. Appl. Genet. – 2006. – Vol. 113. – P. 177–185.
12. Comstock, R.E. The components of genetic variance in populations of biparental progenies and their use in estimating the average degree of dominance / R.E. Comstock, H.F. Robinson // Biometrics. – 1948. – Vol. 4 (3). – P. 254–266.
13. Database derived microsatellite markers (SSRs) for cultivar differentiation in *Brassica oleracea* L. / S. Louarn [et al.] // Genet. Resour. Crop. Evol. – 2007. – Vol. 54. – P. 1717–1725.
14. Tonguc, M. Genetic relationships of Brassica vegetables determined using database derived simple sequence repeats / M. Tonguc, Ph.D. Griffiths // Euphytica. – 2004. – Vol. 137. – P. 193–201.
15. Peakall, R. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research – an update / R. Peakall, P.E. Smouse // Bioinformatics. – 2012. – Vol. 28. – P. 2537–2539.

M.N. Shapturenko<sup>1</sup>, T.V. Pechkovskaya<sup>1</sup>, A.V. Yakimovitch<sup>2</sup>, Y.M. Zabara<sup>2</sup>, S.V. Vakula<sup>1</sup>,  
L.V. Khotyleva<sup>1</sup>

## PROGNOSTIC POTENTIAL OF SSR MARKERS FOR F<sub>1</sub> WHITE CABBAGE (*BRASSICA OLERACEA* L.) HYBRIDS SELECTION

<sup>1</sup>Institute of Genetics and Cytology, NAS of Belarus  
Minsk BY-220072, the Republic of Belarus

<sup>2</sup>Institute of Vegetable Growing  
Samokhvalovichy BY-223013, the Republic of Belarus

The role of molecular-genetic divergence of parental accessions in the formation of the F<sub>1</sub> heterozygous advantage has been studied. The allelic composition of microsatellite loci of white cabbage was screened. Genetic analysis of lines and hybrids obtained according to the full diallel mating design was carried out. As a result, it was shown that general and locus-specific heterozygosity are important in the formation of the F<sub>1</sub> heterotic response and the evaluation of molecular genetics polymorphism may be an additional criterion in the planning of crosses in white cabbage breeding for heterosis.

**Key words:** heterosis, F<sub>1</sub> performance, SSR polymorphism, *Brassica oleracea*, F<sub>1</sub> hybrids.

*Дата поступления статьи: 15 октября 2017 г.*

## РОЛЬ *NDR1* В РЕАКЦИИ РАСТЕНИЙ *NICOTIANA BENTHAMIANA* НА ЗАРАЖЕНИЕ БАКТЕРИЯМИ *PECTOBACTERIUM CAROTOVORUM*

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

Изучение роли компонентов сигнальных цепей растений – процесс довольно сложный и длительный. При помощи методики вирус-индуцированного сайленсинга генов изучалась роль белка *NDR1* в индукции защитного ответа растений *Nicotiana benthamiana* на внедрение патогена *Pectobacterium carotovorum*. Характер ответа растений на инфильтрацию суспензиями клеток различных штаммов *P. carotovorum* предполагает, что белок *NDR1*, а, следовательно, и R-белок этого пути активации иммунитета, не участвуют в распознавании эффектора DspE, в то же время данные свидетельствуют в пользу наличия другого (-их) эффектора (-ов) ССТТ *P. carotovorum*, участвующего (-их) в развитии заболевания у растений семейства Пасленовые.

**Ключевые слова:** система секреции третьего типа, эффекторы, *NDR1*, иммунитет растений

### Введение

Молекулярные механизмы иммунных реакций растений в ответ на внедрение патогенов до сих пор до конца не выяснены. В исследованиях на эту тему предпочтение отдается очень ограниченному кругу растений, среди которых, пожалуй, самым изученным является резуховидка Таля (*Arabidopsis thaliana*). Иммунная сигнализация у разных видов растений отличается и имеет свои особенности, однако общая схема взаимодействий по большому счету остается неизменной. Согласно гипотезе стража [1], различного рода изменения, происходящие в клетках или межклеточном пространстве растений, вызванные внедрением патогенов, детектируются рецепторами растений и вызывают соответствующие иммунные реакции. Однако патогены научились манипулировать иммунитетом растений при помощи различных эффекторов, вводимых прямо в клетку хозяина при помощи различных систем секреции, чаще всего системы III типа (ССТТ). В свою очередь, на такие действия патогенов растения могут реагировать активацией белков устойчивости (R-белков) и запуском эффектор-индуцированного иммунитета.

*A. thaliana* обладает двумя семействами цитоплазматических R-белков: TIR-NB-LRR и CC-NB-LRR. R-белки этих семейств реагируют на доставляемые с помощью системы

секреции третьего типа эффекторы патогенов, среди которых лучше всего изучены многочисленные эффекторы *Pseudomonas syringae*.

RPS4, типичный представитель семейства TIR-NB-LRR, распознает эффекторы, действующие на транскрипционные факторы WRKY [2], и передает сигнал с участием посредника EDS1 (enhanced disease susceptibility), что ведет клетки к аутофагии [3]. RPM1 и RPS2 (семейство CC-NB-LRR) в клетках растений в норме связаны с белком RIN4 (RPM1 interacting protein 4), их негативным регулятором, а также с белком *NDR1* (non race-specific disease resistance 1), являющимся позитивным регулятором системной приобретенной устойчивости (SAR). Воздействие соответствующих белков авирулентности вызывает либо фосфорилирование RIN4 и активацию RPM1 с последующей аутофагией, либо протеолиз RIN4 (в случае с RPS2) и титрование участка RIN4 белком *NDR1*, в результате чего снимается супрессия R-белка RPS2 и активируется RPS2-опосредованная устойчивость и независимая от аутофагии смерть клеток [4]. На начальных этапах ответа пути TIR-NB-LRR и CC-NB-LRR могут конвергировать после активации EDS1 и *NDR1* соответственно на уровне RAR1 и SGT1. Эти события приводят к генерации активных форм кислорода

и запуску реакции гиперчувствительности, а также к активации MAP-киназного сигнального каскада. Однако после активации EDS1 события могут развиваться по пути активации салицилатзависимых генов, регулирующих в том числе MAP-киназным каскадом. Эти события стимулируют транслокацию белка NPR1 (non-expressor of PR1) в ядро, где он взаимодействует с транскрипционными факторами TGA, в результате чего запускается экспрессия PR-генов и защитный ответ [5].

Основными бактериальными патогенами семейства Пасленовые являются бактерии рода *Pectobacterium*, вызывающие мокрые гнили клубней при хранении и заболевание вегетирующих растений «черная ножка». Механизмы распознавания растениями этого патогена изучены значительно слабее. На данный момент единственным известным эффектором ССТТ бактерий *P. carotovorum* является белок DspE – гомолог эффектора DspA/E *Erwinia amylovora* [6]. Инактивация этого эффектора в клетках пектобактерий ведет к уменьшению интенсивности реакции гиперчувствительности, а также к изменению уровня экспрессии защитных генов у растений-хозяев семейства *Solanaceae* [7]. Ранее в нашей лаборатории было проведено исследование, целью которого являлся поиск в протеоме растений семейства пасленовых последовательностей-кандидатов на роль трансмембранных рецепторных киназ LRR-RLK, потенциально взаимодействующих с эффектором DspE *P. carotovorum*. Такие RLK были найдены и идентифицированы как RLK2 и RLK5 [8, 9]. При взаимодействии киназ RLK2 и RLK5 с эффектором

DspE патогена *P. carotovorum* происходят изменения в работе сигнальной цепи и запуск реакции гиперчувствительности в области первичного контакта с патогеном, а так как пектобактерии являются некротрофами, такая реакция растения приводит к успешной его колонизации [10].

В нашей лаборатории ранее показано участие киназ SIPK и WIPK в детекции пектобактерий [11], а среди других компонентов сигнальных цепей исследованы SGT1 и EDS1. Проведенные ранее эксперименты по сайленсингу гена *EDS1* в растениях *N. benthamiana* с последующим заражением этих растений штаммами *P. carotovorum* (дикого типа и дефектными по различным компонентам ССТТ) не дали отличных от контролей результатов, а значит R-белки типа TIR-NB-LRR не участвуют в активации защитного ответа у данного вида пасленовых. В связи с этим было решено проверить влияние компонента того же уровня другого пути активации иммунного ответа, действующего через CC-NB-LRR, а именно белка NDR1.

### Материалы и методы

В исследовании использовались растения табака *N. benthamiana*, выращенные при 20 °С и 16-часовом световом дне. Штаммы пектобактерий *P. carotovorum* JN42, *P. carotovorum* VKE и *P. carotovorum* TA5, а также агробактерий *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 культивировали на среде LB при 28 °С. Конструкции, использованные для проведения вирус-индуцированного сайленсинга, а также характеристики штаммов бактерий указаны в таблице.

### Характеристика использованных штаммов и плазмид

Штамм/плазида	Характеристика	Источник/ссылка
<i>P. carotovorum</i> JN42	г <sup>-</sup> Cm <sup>R</sup> (Tn9) Rif <sup>R</sup> , производный от природного изолята <i>P. carotovorum</i> 3-2	Коллекция кафедры молекулярной биологии БГУ
<i>P. carotovorum</i> TA5	JN42 <i>hrpL</i> ::Ω <sup>Sp/Sm</sup>	[12]
<i>P. carotovorum</i> VKE	JN42 <i>dspE</i> ::pJP5603	[7]
<i>A. tumefaciens</i> GV3101	Rif <sup>R</sup> , Gen <sup>R</sup> , vir <sup>+</sup>	Dinesh-Kumar et al., 2005 Arabidopsis Biological Resource Center
p1039	кДНК PHK1 TRV (pTRV1)	Dinesh-Kumar et al., 2005 Arabidopsis Biological Resource Center

## Окончание таблицы

Штамм/плазмида	Характеристика	Источник/ссылка
p1044	кДНК РНК2 TRV (pTRV2:: <i>GFP</i> )	Dinesh-Kumar et al., 2005 Arabidopsis Biological Resource Center
p1046	кДНК РНК2 TRV (pTRV2:: <i>PDS</i> )	Dinesh-Kumar et al., 2005 Arabidopsis Biological Resource Center
p1052	кДНК РНК2 TRV (pTRV2:: <i>SGT1</i> )	Коллекция кафедры молекулярной биологии БГУ
pTRV2:: <i>NDR1</i>	кДНК РНК2 TRV (pTRV2:: <i>NDR1</i> )	Коллекция кафедры молекулярной биологии БГУ

Вирус-индуцированный сайленсинг осуществлялся по методике [13]. После трансформации растения помещались в климатическую камеру с 16-часовым световым днем и температурой 24 °С. Заражение растений и процедура учета результатов по 5-бальной шкале описаны в [14]. Оценка значимости различий в реакциях растений на введение патогенов производилась при помощи критерия Крускала-Уоллиса в программе Statistica (версия 6.0.668.0). Для статистической обработки результатов заражения оценивали реакцию не менее 6 растений в каждой группе.

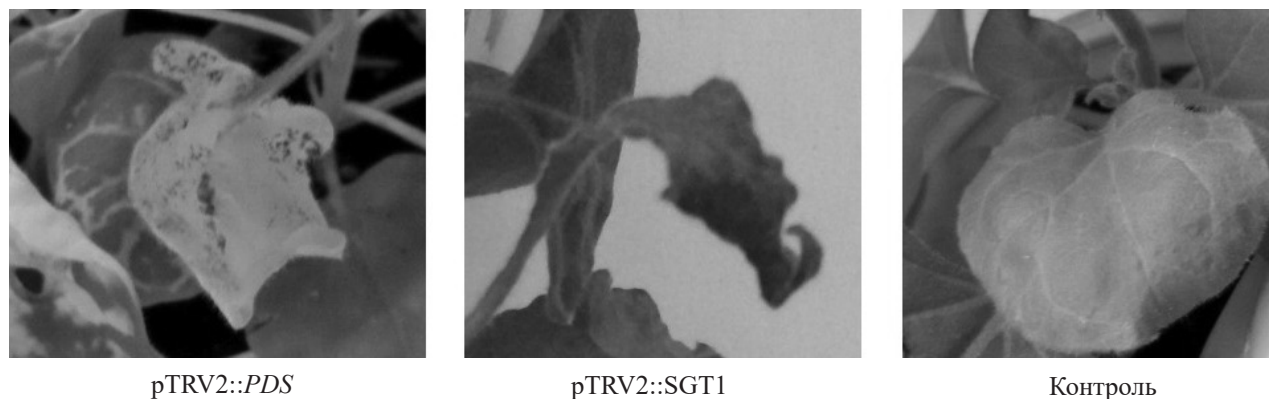
### Результаты и обсуждение

Самым простым способом выяснения функции элемента системы является его инактивация. Этот подход используется и для выяснения механизма защитного ответа растений. Наиболее быстрым и простым способом инактивации генов растений является вирус-индуцированный сайленсинг (ВИСГ),

что и обусловило его выбор в настоящей работе для инактивации генов компонентов сигнальных цепочек.

В качестве положительных контролей сайленсинга использовались конструкции, содержащие ген фитоиндесауразы *PDS*, фермента, участвующего в биосинтезе каротиноидов (сайленсинг *PDS* приводит к утрате растением пигментации), и *SGT1*, компонента сигнальной цепи растения, фенотип сайленсинга которого – зауженные и удлиненные деформированные листья. Первые признаки сайленсинга гена *PDS* начали проявляться через неделю после трансформации, *SGT1* – через две недели. Через 30 дней у этих растений наблюдался ярко выраженный фенотип (рис. 1), стабильно сохранявшийся в дальнейшем на протяжении более четырех недель.

Для выяснения роли гена *NDR1* растений во взаимодействии с патогеном по истечении 35 суток с момента индукции ВИСГ производилась инфильтрация растений суспензией



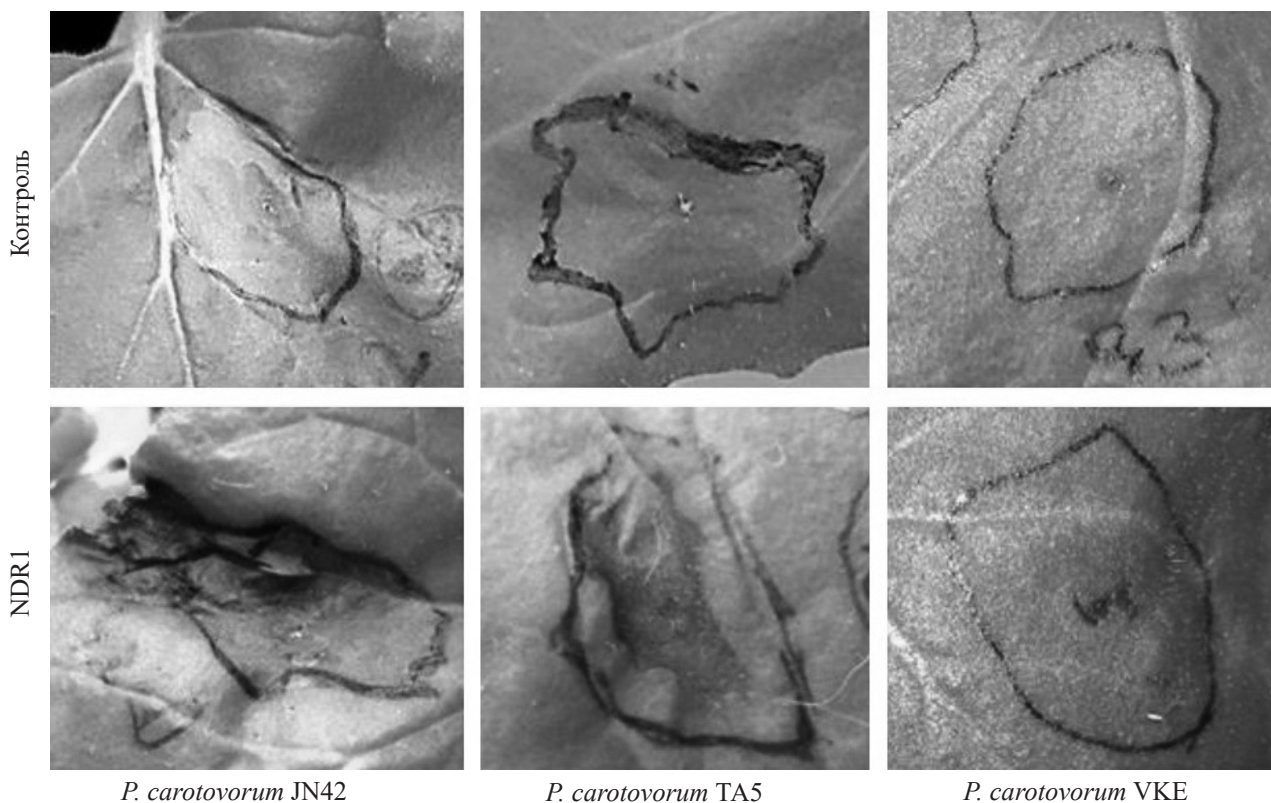
**Рис. 1.** Индукция сайленсинга генов *PDS* и *SGT1* в растениях *N. benthamiana* после инфильтрации суспензией клеток *A. tumefaciens* GV3101 с соответствующими конструкциями в сравнении с контролем – неинфильтрованным растением (справа)

пензиями бактерий различных штаммов *P. carotovorum*, а именно *P. carotovorum* JN42 (штамм дикого типа), *P. carotovorum* TA5 (штамм с мутацией в гене ключевого компонента системы секреции третьего типа, в результате которой данная система секреции не формируется) и *P. carotovorum* VKE (штамм, мутантный по гену единственного известного на данный момент эффектора DspE той же системы секреции). В качестве негативных контролей использовались растения, инфильтрованные 10 мМ MgSO<sub>4</sub>, и нетронутые растения.

У контрольных растений наблюдались следующие реакции (рис. 2): на внедрение патогена *P. carotovorum* JN42 растения отвечали индукцией реакции гиперчувствительности по всей зоне инфильтрации, а в ответ на проникновение штаммов *P. carotovorum* TA5 и *P. carotovorum* VKE реакции гиперчувствительности не наблюдалось или она была очень слабой. Такой ответ на контакт с клетками *P. carotovorum* характерен

для растений семейства Пасленовые. Инфильтрация 10 мМ MgSO<sub>4</sub> видимой реакции не давала.

Иная картина наблюдалась у растений с сайленсингом гена *NDR1*. Здесь, как и у контрольных растений, видна сильная индукция реакции гиперчувствительности в ответ на штамм дикого типа *P. carotovorum* JN42, в некоторых случаях наблюдалось увядание или мацерация листа. В ответ на проникновение штамма *P. carotovorum* TA5 (с полностью инактивированной системой секреции третьего типа) растения с сайленсингом целевого гена реагировали сильнее в сравнении с контрольными. Здесь реакция гиперчувствительности охватывала до 70% зоны инфильтрации. Штамм *P. carotovorum* VKE индуцировал очень слабую реакцию гиперчувствительности в растениях или не индуцировал ее вовсе, как и у растений без сайленсинга гена *NDR1*. Инфильтрация 10 мМ MgSO<sub>4</sub> также видимой реакции не давала.



**Рис. 2.** Типичная реакция контрольных растений (верхний ряд) и растений с сайленсингом гена *NDR1* (нижний ряд) *N. benthamiana* на инфильтрацию суспензиями клеток различных штаммов *P. carotovorum* плотностью  $1,5 \cdot 10^8$  клеток/мл. Фотографии сделаны через 24 часа после инфильтрации

Таким образом, реакция контрольных и опытных растений оказалась очень похожей при использовании для заражения штаммов дикого типа (интенсивная реакция гиперчувствительности) и *dspE*-мутанта (практически полное отсутствие реакции), тогда как четкие отличия наблюдались только при использовании штамма TA5, причем значимость различий в последнем случае подтверждается при статистической обработке (рис. 3). Повторные опыты показали воспроизводимость этих результатов.

Стоит отметить, что в экспериментах на *A. thaliana* инактивация *NDR1* влекла за собой уменьшение реакции гиперчувствительности в ответ на патоген [15]. Усиление же экспрессии этого гена повышало устойчивость к патогену путем увеличения интенсивности сверхчувствительности, что отлично работает, поскольку патоген *P. syringae* является биотрофом, то есть извлекает питательные вещества непосредственно из живых клеток, а отмирание ткани (а также индукция защитных генов в месте колонизации, а также в прилегающей области) ведет, соответственно, к гибели патогена [16, 17]. В нашем эксперименте реакция гиперчувствительности в растениях с сайленсингом *NDR1* только усиливалась, как в ответ на контакт с клет-

ками *P. carotovorum* штамма дикого типа (наблюдалась мацерация и увядание листьев), так и дефектными по всей системе секреции третьего типа. В данном случае, в связи с тем, что *P. carotovorum* является некротрофным патогеном и получает только выгоду (питание) от некроза листа, можно заключить, что растения при снижении уровня экспрессии *NDR1* становятся более чувствительными к патогену.

Учитывая полученные данные, а именно отсутствие выраженной реакции на внедрение штамма *P. carotovorum* VKE, можно заключить, что DspE, единственный известный эффектор системы секреции третьего типа *P. carotovorum*, не взаимодействует с *NDR1* ни напрямую, ни опосредованно. Однако инактивация всей системы секреции повышает чувствительность к заражению растений с сайленсингом *NDR1*, в связи с чем можно предположить, что в контроле индукции реакции гиперчувствительности, опосредованном *NDR1*, участвует другой(-ие) эффектор(ы) той же системы секреции.

Ген *NDR1* кодирует сходный с интегринами белок, который взаимодействует *in vivo* с RIN4, в норме отвечающим за инактивированное состояние цитоплазматических R-бел-

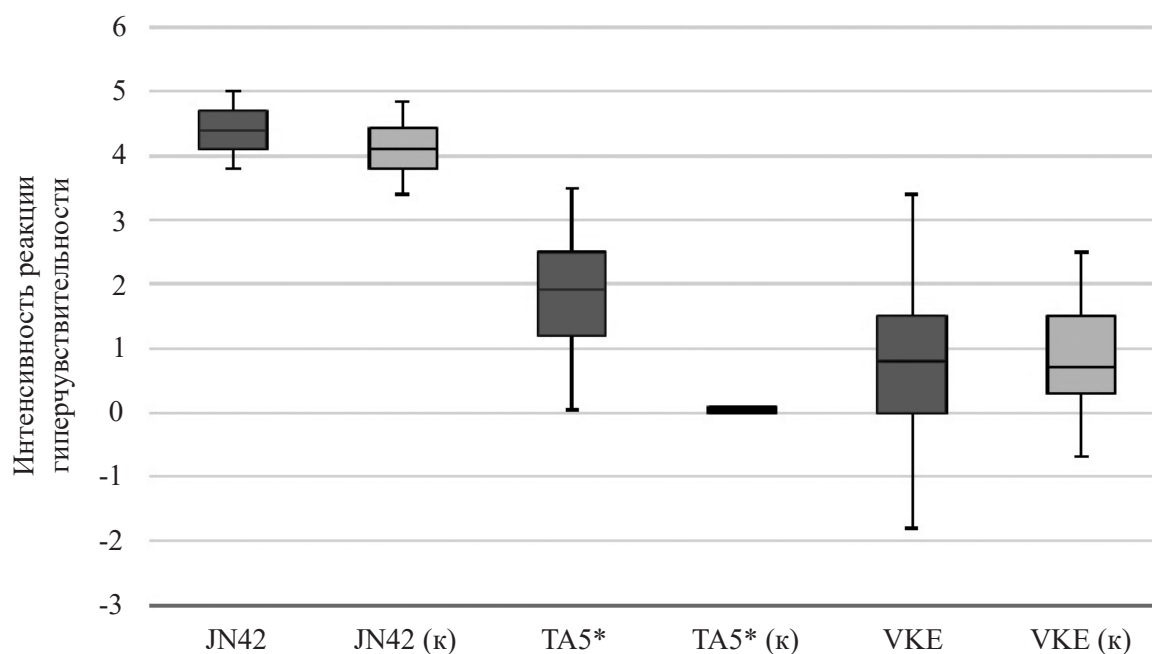


Рис. 3. Интенсивность реакции гиперчувствительности при контакте бактерий разных штаммов *P. carotovorum* с растениями *N. benthamiana*, подвергнутыми сайленсингу *NDR1* и с контрольными (к) ( $p = 0,0238$ )



ков [4]. Показано, что NDR1 дважды заякорен в мембране и может образовывать гомодимеры, что предположительно усиливает защитный ответ после детекции эффектора. Цитоплазматическая часть NDR1 связана с компонентами иммунитета, запускающими MAP-киназный сигнальный каскад, ведущий к индукции ETI (эффектор-индуцированного иммунитета), а, следовательно, и к запуску реакции гиперчувствительности. Внецитоплазматический домен NDR1 контактирует с клеточной стенкой [11], а значит, белок NDR1 может выступать в качестве сенсора целостности клеточной стенки, что особенно актуально при распознавании разрушающих стенки растительных клеток патогенов, к числу которых относится и *P. carotovorum*. Дополнительный эффектор (или эффекторы) патогена, о наличии которого свидетельствует настоящая работа, может препятствовать детекции растением нарушения целостности клеточной стенки и блокировать активацию защитной реакции.

### Заключение

Наши эксперименты впервые демонстрируют участие NDR1 *N. benthamiana* в детекции *P. carotovorum*, а также являются первым свидетельством в пользу наличия у этих бактерий как минимум еще одного эффектора системы секреции III типа помимо описанного ранее DspE. Поскольку базовые механизмы детекции патогенов различными растениями семейства Пасленовые очень похожи, представленные здесь результаты, помимо фундаментальной значимости, могут способствовать созданию устойчивых к бактериозам сортов хозяйственно ценных представителей семейства.

### Список использованных источников

1. Jones, J.D.G. The plant immune system / J.D.G. Jones, J.L. Dangl // *Nature*. – 2006. – Vol. 444, № 7117. – P. 323–329.
2. A Plant Immune Receptor Detects Pathogen Effectors that Target WRKY Transcription Factors / P.F. Sarris [et al.] // *Cell*. – 2015. – Vol. 161, № 5. – P. 1089–1100.
3. Sohn, K.H. The *Pseudomonas syringae* effector protein, AvrRPS4, requires in planta processing and the KRVY domain to function /

K.H. Sohn, Y. Zhang, J.D.G. Jones // *The Plant Journal*. – 2009. – Vol. 57, № 6. – P. 1079–1091.

4. Day, B. NDR1 Interaction with RIN4 Mediates the Differential Activation of Multiple Disease Resistance Pathways in Arabidopsis / B. Day, D. Dahlbeck, B.J. Staskawicz // *The Plant Cell*. – 2006. – Vol. 18, № 10. – P. 2782–2791.

5. Joshi, R.K. Functional characterization and signal transduction ability of nucleotide-binding site-leucine-rich repeat resistance genes in plants / R.K. Joshi, S. Nayak // *Genetics and molecular research: GMR*. – 2011. – Vol. 10, № 4. – P. 2637–2652.

6. Николайчик, Е.А. Фитопатоген *Pectobacterium carotovorum* использует аппарат секреции III типа для блокирования системного защитного ответа растения-хозяина / Е.А. Николайчик, Л.Л. Хомская, Е.И. Игнатенко // *Труды Белорусского государственного университета*. – 2009. – № 4. – С. 189–196.

7. Транслокация белка DspE фитопатогенными бактериями *Erwinia carotovora subsp. atroseptica* в клетки *Nicotiana tabacum* и его необходимость для индукции реакции гиперчувствительности / Е.А. Николайчик [и др.] // *Доклады НАН Беларуси*. – 2005. – Т. 49, № 5. – С. 81–85.

8. Роль рецепторподобной трансмембранной киназы растений семейства Пасленовых во взаимодействии с фитопатогеном *Pectobacterium carotovorum* / Е.А. Николайчик [и др.] // *Доклады Национальной академии наук Беларуси*. – 2012. – Т. 56. – С. 106–112.

9. Бадалян, О.А. Рецепторподобная киназа RLK2 растений семейства пасленовых участвует в детекции некротрофного патогена *Pectobacterium carotovorum* / О.А. Бадалян, Е.В. Кулик // *Сборник работ 69-й научной конференции студентов и аспирантов Белорусского государственного университета*. – 2013. – Т. 1. – С. 3–6.

10. Бадалян, О.А. Рецепторподобные киназы RLK2 и RLK5 *Nicotiana benthamiana* участвуют в регуляции экспрессии генов ключевых компонентов иммунной системы растения при контакте с *Pectobacterium carotovorum* / О.А. Бадалян, Е.А. Николайчик // *Известия национальной академии наук Беларуси*. – 2014. – Т. 4. – С. 75–80.

11. Бадалян, О.А. Влияние сайленсинга генов MAP-киназ SIPK и WIPK растений *Nicotiana benthamiana* на активацию системной устойчивости при инфицировании бактериями *Pectobacterium carotovorum* / О.А. Бадалян, Е.А. Николайчик // Известия национальной академии наук Беларуси. – 2014. – № 3. – С. 70–73.
12. The use of alternative sigma factor HrpL to improve expression of the type III secretion machinery of *Erwinia carotovora subsp. atroseptica* / T.V. Ovchinnikova [et al.] // Biotechnology in Agriculture and the Food Industry. – 2004. – P. 141–148.
13. Liu, Y. Virus-induced gene silencing in tomato / Y. Liu, M. Schiff, S.P. Dinesh-Kumar // The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology. – 2002. – Vol. 31, № 6. – P. 777–786.
14. Бадалян, О.А. Участие MAP-киназ WIPK и SIPK растений *Nicotiana benthamiana* в детекции фитопатогена *Pectobacterium carotovorum* / О.А. Бадалян, Е.А. Николайчик // Доклады НАН Беларуси. – 2013. – Т. 57, № 6. – С. 75–81.
15. Shapiro, A.D. The Role of NDR1 in Avirulence Gene-Directed Signaling and Control of Programmed Cell Death in Arabidopsis / A.D. Shapiro, C. Zhang // Plant Physiology. – 2001. – Vol. 127, № 3. – P. 1089–1101.
16. Overexpression of the plasma membrane-localized NDR1 protein results in enhanced bacterial disease resistance in *Arabidopsis thaliana* / P. Coppinger [et al.] // The Plant Journal. – 2004. – Vol. 40, № 2. – P. 225–237.
17. Katagiri, F. The *Arabidopsis Thaliana*-*Pseudomonas Syringae* Interaction / F. Katagiri, R. Thilmoney, S.Y. He // The Arabidopsis Book / American Society of Plant Biologists. – 2002. – Vol. 1.

A.V. Kolubako, Y.A. Nikolaichik

## ROLE OF NDR1 IN THE REACTION OF *NICOTIANA BENTHAMIANA* PLANTS TO *PECTOBACTERIUM CAROTOVORUM* INFECTION

Belarusian State University  
Minsk BY-220030, the Republic of Belarus

Studying the role of plant signal chains' components is a rather complicated and lengthy process. Using the virus-induced gene silencing technique, the role of NDR1 protein in the induction of the protective response of *N. benthamiana* plants during *P. carotovorum* infection was studied. The way plants respond to infiltration by cell suspensions of various *P. carotovorum* strains suggests that the protein NDR1 and, therefore, the R-protein of the same pathway of immunity activation, does not participate in effector DspE recognition while the data support the presence of the other effector(s) of the TTSS *P. carotovorum* participating in the disease development in plants from the *Solanaceae* family.

**Key words:** type three secretion system, effectors, NDR1, plant immunity

Дата поступления статьи: 1 августа 2017 г.

Л.Н. Сивицкая<sup>1</sup>, Т.Г. Вайханская<sup>2</sup>, Н.Г. Даниленко<sup>1</sup>, Т.В. Курушко<sup>2</sup>, О.Г. Давыденко<sup>1</sup>

## МУТАЦИИ В ГЕНЕ *LMNA*, ПРИВОДЯЩИЕ К КОНФОРМАЦИОННЫМ ИЗМЕНЕНИЯМ ЛАМИНОВ А/С И РАЗВИТИЮ ДИЛАТАЦИОННОЙ КАРДИОМИОПАТИИ

<sup>1</sup>Институт генетики и цитологии НАН Беларуси  
Республика Беларусь, 220072, г. Минск, ул. Академическая, 27  
e-mail: cytoplasmic@mail.ru

<sup>2</sup>Республиканский научно-практический центр «Кардиология»  
Республика Беларусь, 220036, г. Минск, ул. Р. Люксембург, 110

Представлены три случая ламинопатий, ассоциированные с носительством мутаций в гене *LMNA*: дилатационной кардиомиопатии 1А (ДКМП), конечностно-поясной мышечной дистрофии 1В и мышечной дистрофии Эмери-Дрейфуса типа 2. Диагнозы были верифицированы у трех неродственных пациентов по результатам комплексного клинического исследования. Методом прямого секвенирования был осуществлен поиск мутаций в экзонах гена *LMNA* на образцах ДНК пациентов. Выявлены нуклеотидные замены, приводящие к миссенс-мутациям в ламинах А/С: с.1558Т>С (р.W520R), с.1583С>G (р.T528R), а также новая, ранее не описанная мутация с.569G>C (р.R190P). Исследование родственников пациентов определило возникновение мутаций *de novo* во всех трех случаях. Анализ родословных выявил связь мутаций с появлением в семьях заболевания, ранее нехарактерного для их членов. Проведен сравнительный анализ опубликованных клинических случаев с подобными мутациями, выявлены особенности в возрасте и тяжести манифестации дилатационной кардиомиопатии у носителей р.T528R и р.R190P.

**Ключевые слова:** ламин А/С, ген *LMNA*, дилатационная кардиомиопатия, ламинопатии.

### Введение

Ламиновые белки являются структурными компонентами ядерной ламины – белковой сети, лежащей под внутренней мембраной ядра и определяющей его форму и размер. Первые данные о заболевании, связанном с мутацией в гене ламин А/С (*LMNA*), были получены в 1999 году, а первой установленной ламинопатией оказалась мышечная дистрофия Эмери-Дрейфуса, которая, помимо патологии скелетных мышц, сопровождалась кардиомиопатическими дефектами или дефектами проводящей системы сердца [1].

Вскоре после первой публикации было показано, что мутация *LMNA* в гетерозиготном состоянии является также причиной двух других болезней, которые имеют с аутосомно-доминантной мышечной дистрофией Эмери-Дрейфуса несколько сходных клинических симптомов: дилатационной кардиомиопатии с дефектами проведения и конечностно-поясной мышечной дистрофии. Уже

тогда стало очевидно, что ламинопатии представляют собой группу тяжелых заболеваний, имеющих сходную природу, но различные проявления [2].

Структура и локализация гена *LMNA*, особенности его экспрессии, пространственная структура ламин, их функции в клетке изучены достаточно хорошо. Подробно описан ряд обнаруженных мутаций и связанные с ними клинические проявления. Вместе с тем, в полной мере пока не ясны механизмы реализации конкретной мутации в гене *LMNA* в манифестирующее заболевание.

Влияние генетических факторов на развитие и течение дилатационной кардиомиопатии интенсивно исследуется в лабораториях многих стран мира. Для Беларуси, в которой число пациентов с дилатационной кардиомиопатией исчисляется сотнями, эти данные, несомненно, актуальны не только с научной точки зрения, но и для разработки тактики терапевтического и, если необходимо, кардиохирургического вмешательства.

В статье представлены три случая ламинопатий: дилатационная кардиомиопатия с дефектами проводимости (ОММ 115200), конечностно-поясная мышечная дистрофия 1В (ОММ 159001) и аутосомно-доминантная форма миодистрофии Эмери-Дрейфуса (ОММ 181350). Подробно обсуждается новая миссенс-мутация (p.R190P) в *rod*-домене ламина А/С.

## Материалы и методы

### Клинические исследования

Все пациенты проходили обследование в РНПЦ «Кардиология» (Минск, Беларусь). Диагноз дилатационной кардиомиопатии (ДКМП) был выставлен в соответствии с установленными в настоящее время критериями [3]. История болезни была детально изучена, проведены неврологические и кардиологическое обследование. Последнее включало электрокардиографию (ЭКГ), 24-часовой ЭКГ-мониторинг, эхокардиографию, магнитно-резонансную томографию (МРТ) и лабораторные исследования. Миокардит и болезнь коронарных артерий были исключены с помощью серологического скрининга и коронарной ангиографии. Системные заболевания также были исключены.

Диагнозы конечностно-поясной мышечной дистрофии (КПМД) и миодистрофии Эмери-Дрейфуса (МДЭД) были установлены в соответствии с рекомендациями Muscular Dystrophy Association для двух неродственных пациентов [4, 5].

### История пациентов

*Клинический случай 1.* У пациентки 23-х лет первые симптомы ДКМП1А (частое сердцебиение, атриовентрикулярная (АВ) блокада 1–2 ст.) предшествовали развитию дилатационного фенотипа и сердечной недостаточности (СН). Фибрилляция предсердий с полной АВ-блокадой и обмороки появились на стадии дилатации всех камер сердца. Несмотря на проводимую медикаментозную терапию, в дальнейшем симптомы СН прогрессировали с развитием негативного ремоделирования сердца, асцита и гидроперикарда; и пациентке с клиническими признаками терминальной СН, резистентной к фармакотерапии, была выполнена ортотопическая трансплантация сердца.

*Клинический случай 2.* У 27-летней женщины заболевание манифестировало в виде обморо-

ков, обусловленных полной АВ-блокадой, но еще без признаков дилатации камер сердца и систолической дисфункции. Симптомы СН с быстро прогрессирующим дилатационным ремоделированием сердца, левожелудочковой дисфункцией появились через 3 года после имплантации электрокардиостимулятора. С детских лет пациентку беспокоили эпизодические боли в икроножных мышцах, но за медицинской помощью не обращалась, обследование скелетной мускулатуры не проводилось. Прогрессирующая мышечная слабость и боли в мышцах, гипотрофия скелетных мышц нижних конечностей появились одновременно с признаками прогрессирующей СН в возрасте 27–30 лет. Пациентка отличалась субтильным телосложением с выраженным поясничным гиперлордозом, с симптомами «крыловидных лопаток» и «перонеальной походки». Прогрессирующая слабость и боли в скелетных мышцах, гипотрофия мышц нижних конечностей развивались одновременно с симптомами СН.

*Клинический случай 3.* У пациента с диагнозом мышечной дистрофии Эмери-Дрейфуса первые признаки слабости в мышцах верхних и нижних конечностей появились в 5-летнем возрасте и усиливались по мере взросления. К третьей декаде жизни ретракция ахилловых сухожилий и заднешейных мышц отразились на изменении походки «по типу утиной» с появлением вынужденной позы пациента с запрокидыванием головы назад. Преимущественное поражение заднешейных, перонеальных мышц и мускулатуры проксимальных отделов рук симметричного характера прогрессировало с возрастом, приводя к контрактурам в шейном отделе позвоночника, локтевых и голеностопных суставах. В возрасте 40 лет у пациента появились жалобы на слабость, предобморочные состояния и приступы потери сознания. При комплексном исследовании сердца выявлены нарушения сердечного ритма (фибрилляция предсердий) и проводимости (полная атриовентрикулярная блокада) с умеренной дилатацией обоих желудочков и систолической дисфункцией преимущественно левого желудочка.

### Генетический анализ

Информированное согласие на выполнение генетического анализа и анонимную публикацию результатов было получено от всех лиц, участвовавших в этом исследовании.

Геномная ДНК была экстрагирована из образцов капиллярной крови стандартным фенол-хлороформным методом. Экзоны гена *LMNA* и область стыка экзон-интрон были секвенированы в обоих направлениях с помощью BigDye © Terminator v3.1. Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems Inc., США) на приборе 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems Inc., США). Последовательности праймеров (Праймтех, Беларусь) и условия ПЦР доступны по запросу.

Выявленные мутации были верифицированы методом ПДРФ с использованием эндонуклеаз Thermo Fisher Scientific Inc., США. Так, вариант p.W520R вводит MspI-сайт, а мутация p.T528R удаляет RsaI-сайт в экзоне 9. Замена p.R190P разрушает сайт для эндонуклеазы FaeI в экзоне 3. Рестриктивные фрагменты разделяли в 8%-ном ПААГ.

#### Web-ресурсы и программы

Анализ данных секвенирования был выполнен с помощью ChromasPro v.1.5. Для оценки влияния выявленных миссенс-вариантов на организацию доменов ламин A/C был использован Protein Interactions Calculator (PIC) [6]. 3D-структура участка стержневого домена ламина A/C была построена с помощью PyMOL. Кристаллическая структура Ig-подобного домена (PDB id: 1IFR) или аминокислотная последовательность белка (UniProtKB: P02545) были использованы в качестве input-файлов, где это было необходимо.

## Результаты и обсуждение

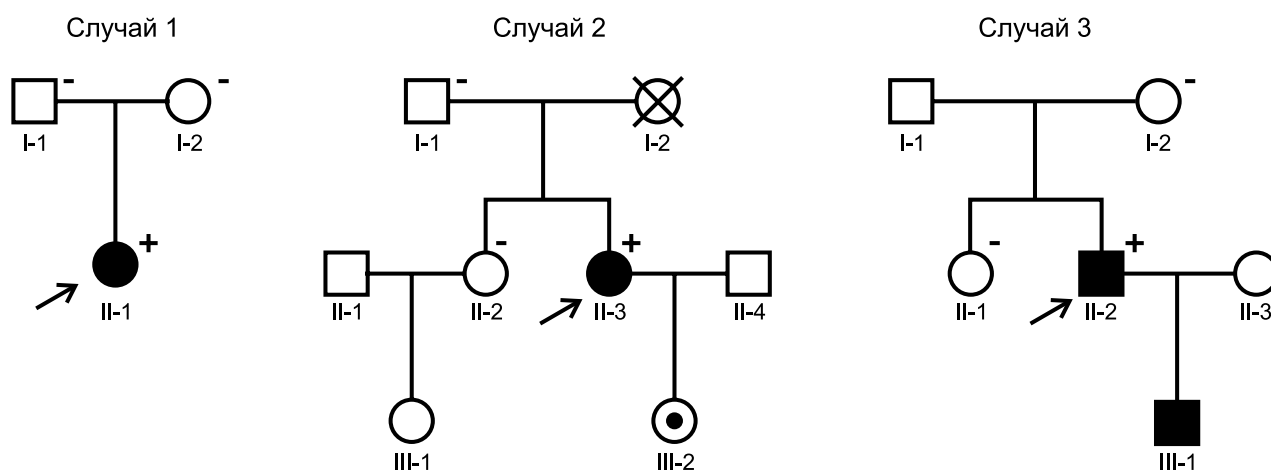
В результате проведенных исследований у представленных пациентов были выявлены нуклеотидные замены, приводящие к миссенс-мутациям в ламинах A/C. Две из них ранее описаны и зарегистрированы в доступных базах данных с.1558T>C (p.W520R), с.1583C>G (p.T528R), а одна – новая с.569G>C (p.R190P) (табл. 1).

#### Мутация с.569G>C (p.R190P)

Эта замена была обнаружена у пациента с ДКМП (клинический случай 1). Результаты генетического тестирования родителей пробанда определили *de novo* возникновение мутации (рис. 1). Ранее в семье не было случаев некоронарогенных заболеваний сердца и/или внезапной сердечной смерти.

Следует отметить, что кодон 190 считается «hot spot» в структуре ламина A/C. По данным UMD-LMNA Mutation Database (<http://www.umd.be/LMNA/>), в этой позиции зарегистрированы мутации, включающие как однонуклеотидные замены, так и малые делеции/инсерции. Согласно этой же базе данных, а также dbSNP NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>), замена с.569G>C (p.R190P) ранее не описана.

Нами был проведен сравнительный анализ всех опубликованных клинических случаев, связанных с носительством миссенс-мута-



Символы белого цвета – члены семьи без проявлений патологии, символы черного цвета – пациенты с установленными диагнозами, круг черного цвета внутри символа – носитель мутации без клинических проявлений, перечеркнутый символ – умерший родственник. Пробанд указан стрелкой. Символы (+) и (-) обозначают наличие мутации или ее отсутствие по результатам ДНК-анализа, отсутствие символа – ДНК-анализ не был проведен.

Рис. 1. Генеалогические древа семей пациентов с ламинопатиями

ций в позиции 190 ламина А/С (табл. 2) [1, 2, 7]. В случае мутации p.R190P сердечная недостаточность манифестировала в более раннем возрасте и сопровождалась тяжелыми нарушениями проводимости в сердечной мышце. Кроме того, у пациента с этой мутацией наблюдались изменения в мышцах конечностей. Повышенный уровень креатинкиназы также свидетельствует о вовлеченности в патогенез поперечно-полосатой мускулатуры. В клинических случаях, обусловленных иной аминокислотной заменой в позиции 190, ДКМП проявлялась в более позднем возрасте и без изменений в скелетных мышцах.

Разница во времени и тяжести манифестации, возможно, обусловлена свойствами аминокислотных остатков, внедренных в позицию 190. Кодон 190 локализуется в экзоне III гена *LMNA*. Этот экзон кодирует альфа-спиральный сегмент coil 1В ламина А/С. Наряду с еще тремя такими же сегментами, названными coil 1А, 2А и 2В, он входит в состав rod-домена. Последний необходим для димеризации ламин и последующей полимеризации в ламиновую сеть [7]. На рис. 2 показана 3D-структура участка coil 1В, несущего разные аминокислотные остатки в положении 190. Замены p.R190Q и p.R190W не приводят к изгибу этого альфа-спирального

Таблица 1

Характеристика мутаций, выявленных в гене *LMNA*

Клинический случай	Замена нуклеотида	Экзон	Замена аминокислотного остатка	Локализация, домен	dbSNP no.
1	c.569G>C	3	p.R190P	Coil 1B	rs267607571
2	c.1558T>C	9	p.W520R	Tail (Ig-fold)	rs267607557
3	c.1583C>G	9	p.T528R	Tail (Ig-fold)	rs57629361

Таблица 2

## Характеристика клинических случаев, связанных с носительством миссенс-мутации в позиции 190 ламина А/С

Критерии сравнения	Мутации		
	p.R190Q	p.R190W	p.R190P
Число сообщений	2	6	1
Свойства аминокислотной замены	Полярная (R) на полярную (Q)	Полярная (R) на неполярную (W)	Полярная (R) на неполярную (P)
Форма и тип наследования	Спорадическая, АД*	Семейная, АД	Спорадическая, АД
Возраст манифестации	42, 45	30–43, 58	24
Сердечный фенотип	ДКМП с дефектом проводимости, АВ**-блокада, ФП***	Три случая: ДКМП без дефекта проводимости или ФП. Три случая: ДКМП с дефектом проводимости, ФП	ДКМП с дефектом проводимости, АВ-блокада, ФП, полная блокада сердца
Изменения в скелетных мышцах	Нет	Нет	Гипотрофия четырехглавой мышцы, гипертрофия икроножных мышц
Уровень креатинкиназы, У/л	–	Норма (24–190)	Повышен (279)
Бессимптомные носители	Да	Да	Нет

\*АД – аутосомно-доминантный тип наследования, \*\*АВ-блокада – атриовентрикулярная блокада сердца, \*\*\*ФП – фибрилляция предсердий

домена, как это показано для p.R190P, а значит, не препятствуют образованию нормальной вторичной структуры белка. Возможно, изменения, вызванные мутациями p.R190Q и p.R190W, являются не столь критичными и поэтому проявляются в более позднем и мягком фенотипе. Следует отметить, что боковые радикалы аминокислотных остатков Q190 и W190 будут препятствовать образованию суперспиральной структуры (третичной, coiled coil) при димеризации молекул ламина A/C, что абсолютно необходимо для формирования ядерной ламина.

#### Мутация с.1558T>C (p.W520R)

Эта нуклеотидная замена была идентифицирована у женщины из клинического случая 2. Кроме сердечной недостаточности, у пациентки была диагностирована конечностно-поясная мышечная дистрофия 1В типа: прогрессирующая слабость и боли в скелетных мышцах, гипотрофия мышц нижних конечностей. Генетическое тестирование родственников 1-ой степени родства пациентки выявило носительство замены у ее дочери (рис. 1). На момент исследований она была асимптоматична в силу малого возраста.

Мутация p.W520R локализуется в коре Ig-домена ламина A/C. Считается, что Ig-домен ламина A/C предназначен для взаимодействия с белками ядерной оболочки, ферментами, факторами транскрипции и ДНК [8]. Мутации в этом домене меняют его пространственную структуру и оказывают влияние на уровень экспрессии многих генов.

По мнению Krimm et al., аминокислотный остаток W520 уникален в структуре Ig-домена и абсолютно необходим для поддержания структуры двух петель через взаимодействие с другими ароматическими аминокислотными остатками [9]. В работах Sirano Dhe-Paganon et al. особое внимание уделяется пяти ароматическим остаткам, включая W520, так как именно они формируют гидрофобную борозду на поверхности домена, которая может быть потенциальным сайтом для взаимодействия с другими белковыми молекулами [10].

Влияние мутации p.W520R на внутримолекулярные взаимодействия Ig-домена было оценено с помощью PIC-сервиса (Protein Interactions Calculator) [6]. Было показано, что

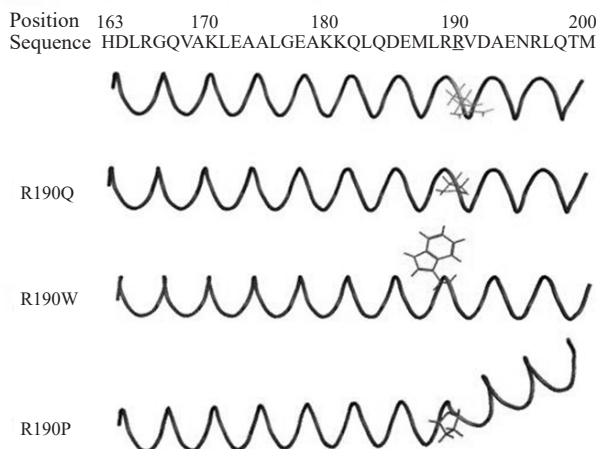


Рис. 2. 3D-структура участка coil 1B домена ламина A/C

длинная боковая цепь аргинина в позиции 520 нарушает водородные связи внутри домена (данные не приведены). Кроме того, расчеты PIC выявили, что внедрение аргинина вместо остатка триптофана неизбежно разрушит связи между ароматическими аминокислотными остатками и катион-π-взаимодействие между W520 и R471 (табл. 3, 4).

Следует отметить, что катион-π-взаимодействие является сильным нековалентным взаимодействием, обязательным для формирования вторичной структуры белков. Оно образуется между электрон-богатой π-системой, в качестве которой в белках выступают ароматические кольца остатков триптофана или фенилаланина, или тирозина, и близко расположенным катионом. Донором последнего в белках выступает NH-группа аргинина или лизина [11].

Описано несколько клинических случаев, ассоциированных с мутацией в позиции 520: Trp520Gly (Тайвань), Trp520Ser (Германия), Trp520Arg (Китай). Все случаи носительства мутации в этом кодоне приводят к развитию дилатационной кардиомиопатии, сочетанной с патологией скелетных мышц – мышечной дистрофией Эмери-Дрейфуса аутосомно-доминантного типа и, как в нашем случае, конечностно-поясной мышечной дистрофией [1, 12, 13]. Схожие фенотипы при замене триптофана в 520 положении связаны, скорее всего, с тем, что все обнаруженные мутации приводят к ликвидации катион-π-взаимодействия 520Trp-471Arg и нарушению связей между ароматическими

Таблица 3

## Ароматические взаимодействия в ламине A/C и их изменения при мутации p.W520R

Ig-домен ламина A/C, дикий тип			Мутация p.W520R		
Аминокислотные остатки, вовлеченные во взаимодействие	D*	Угол	Аминокислотные остатки, вовлеченные во взаимодействие	D	Угол
F451 – W498	5,19	121,07	F451 – W498	5,19	121,07
Y481 – F483	5,13	106,63	Y481 – F483	5,13	106,63
Y481 – W514	5,83	74,09	Y481 – W514	5,83	74,09
Y481 – W520	6,37	122,1	Потеря взаимодействия		
F483 – F487	5,79	145,3	F483 – F487	5,79	145,3
W514 – W520	4,51	51,74	Потеря взаимодействия		

\*D – расстояние между ароматическими кольцами

Таблица 4

## Катион-π-взаимодействия в ламине A/C и его мутантных вариантах

Показатели взаимодействия	Ig-домен ламина A/C, дикий тип	Мутация p.W520R		Мутация p.T528R	
		Потеря взаимодействия T520 – R471	Возникновение нового взаимодействия F451–R520	T520 – R471	Возникновение нового взаимодействия T520 – R528
Аминокислотные остатки, вовлеченные во взаимодействие	T520 – R471	Потеря взаимодействия T520 – R471	Возникновение нового взаимодействия F451–R520	T520 – R471	Возникновение нового взаимодействия T520 – R528
D*	5,73	–	5,45	5,73	4,69
Угол	61,45	–	71,02	61,45	19,18

\*D – катион-π-расстояние

ми аминокислотными остатками. Изменения в балансе слабых (внутримолекулярные водородные связи) и сильных (катион-π и «ароматические» связи) взаимодействий при мутации неизбежно отразятся на стабильности, фолдинге и биохимических свойствах Ig-домена.

## Мутация с.1583C&gt;G (p.T528R)

У носителя мутации p.T528R (клинический случай 3), кроме ламин-ассоциированной ДКМП, выявлена сопутствующая мышечная патология: мышечная дистрофия Эмери-Дрейфуса аутосомно-доминантного типа (EDMD2).

Первые признаки слабости в мышцах верхних и нижних конечностей появились в 5-летнем возрасте и усиливались с возрастом. Предварительно был установлен диагноз мышечной дистрофии Дюшенна/Беккера. Это генетически единая форма дистрофинопатии, ассоциированная с мутациями в гене дис-

трофина, клинически разделяемая на миодистрофию Дюшенна и миодистрофию Беккера. В возрасте 20 лет на основании клинической симптоматики, данных электромиограммы, с учетом активности креатинфосфокиназы и «мягкой формы» течения заболевания диагноз миодистрофии Дюшенна был исключен. И только в возрасте 40 лет при проявлении клинических признаков дилатационной кардиомиопатии, нарушения сердечного ритма и проводимости было выдвинуто предположение о ламин-ассоциированном генезе мышечной дистрофии Эмери-Дрейфуса. Для его верификации был проведен поиск мутаций в гене *LMNA*.

Идентифицированная замена p.T528R расположена в коре Ig-домена ламин A/C. Нахождение остатка треонина в этой позиции имеет принципиальное значение для фолдинга Ig-домена. Это полярный аминокислотный остаток, экстремально «захороненный» внутрь молекулы. Его боковая цепь участвует



в образовании водородных связей с радикалами других аминокислотных остатков, что стабилизирует структуру всего  $\beta$ -сэндвича [10]. Согласно подсчетам PIC-сервиса, внедрение аргинина в положение 528 приведет к образованию дополнительного катион- $\pi$ -взаимодействия (табл. 4). Такие изменения могут повлечь за собой изменение вторичной структуры всего Ig-домена и, как следствие, отсутствие адекватного взаимодействия мутантного ламина A/C с белками ядерной оболочки и транскрипционными факторами. В свою очередь это может обуславливать развитие тяжелой клинической картины при синдроме Эмери-Дрейфуса.

В опубликованных ранее случаях МДЭД, ассоциированной с мутацией р.Т528R, дилатационная кардиомиопатия и нарушения проводимости проявлялись к 30-летнему возрасту пациентов. Более ранними симптомами манифестации сердечной недостаточности были одышка, фибрилляция предсердий и синусовая тахикардия в возрасте 12–23 лет [14–16]. В представленном клиническом случае диагноз МДЭД был заподозрен только в 40-летнем возрасте пациента, когда манифестировала кардиальная патология, специфическая для этого типа мышечной дистрофии.

Исследование родственников 1-ой степени родства определило ее возникновение *de novo*. Изучение родословной показало, что МДЭД, как и другие типы мышечной дистрофии, ранее не были характерны для семьи пациента (рис. 1). Мутация была унаследована сыном пробанда, который также страдает МДЭД.

### Заключение

Молекулярно-генетический анализ гена *LMNA* позволил верифицировать и уточнить диагнозы для трех пациентов, страдающих изолированной или синдромальной формой ДКМП. Были выявлены миссенс-мутации в экзонах, кодирующих функциональные домены ламин A/C. Характер их наследования в семьях пробандов, локализация в «hot spot» и данные литературы свидетельствуют о патогенности этих мутаций. Определение генетической причины развития фенотипа мышечной дистрофии имеет особое значение в выборе терапевтического подхода к заболеванию. Очевидна

необходимость наиболее ранней постановки правильного диагноза у таких пациентов для своевременного принятия мер, направленных на замедление прогрессирования заболевания.

### Список использованных источников

1. Clinical and molecular genetic spectrum of autosomal dominant Emery-Dreifuss muscular dystrophy due to mutations of the lamin A/C gene / G. Bonne [et al.] // *Ann Neurol.* – 2000. – Vol. 48, № 2. – P. 170–180.
2. Missense mutations in the rod domain of the lamin A/C gene as causes of dilated cardiomyopathy and conduction-system disease / D. Fatkin [et al.] // *N Engl J Med.* – 1999. – Vol. 341, № 23. – P. 1715–1724.
3. Classification of the cardiomyopathies: a position statement from the European Society of Cardiology Working Group on Myocardial and Pericardial Diseases / P. Elliott [et al.] // *Eur Heart J.* – 2008. – Vol. 29. – P. 270–276.
4. Emery, A.E.H. Diagnostic Criteria for Neuromuscular Disorders: Discussion document / A.E.H. Emery. – European Neuromuscular Centre. – The Netherlands, 1994.
5. Evidence-based guideline summary: Diagnosis and treatment of limb-girdle and distal dystrophies / P. Narayanaswami [et al.] // Report of the Guideline Development Subcommittee of the American Academy of Neurology and the Practice Issues Review Panel of the American Association of Neuromuscular & Electrodiagnostic Medicine Neurology. – 2014. – Vol. 83. – P. 1453–1463.
6. PIC: Protein Interactions Calculator / K.G. Tina [et al.] // *Nucleic Acids Res.* – 2007 – Vol. 35 (Web Server issue). – P. W473–W476.
7. Laminopathic mutations interfere with the assembly, localization, and dynamics of nuclear lamins / N. Wiesel [et al.] // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 2008. – Vol. 105. – P. 180–185.
8. Functions and dysfunctions of the nuclear lamin Ig-fold domain in nuclear assembly, growth, and Emery-Dreifuss muscular dystrophy / D.K. Shumaker [et al.] // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 2005. – Vol. 102. – P. 15 494–15 499.
9. Krimm, I. The Ig-like structure of the C-terminal domain of lamin A/C, mutated in muscular dystrophies, cardiomyopathy, and partial lipodystrophy / I. Krimm // *Structure.* – 2002. – Vol. 10. – P. 811–823.

10. Structure of the globular tail of nuclear lamin / S. Dhe-Paganon [et al.] // *J Biol Chem.* – 2002. – Vol. 277. – P. 17 381–17 384.
11. Dennis, A. Dougherty Cation-pi interactions involving aromatic amino acids / A. Dennis // *J Nutr.* – 2007. – Vol. 137, № 6 (Suppl. 1). – P. 1504S–1517S.
12. Novel LMNA mutation in a Taiwanese family with autosomal dominant Emery-Dreifuss muscular dystrophy / W. Liang [et al.] // *J Formos Med Assoc.* – 2007. – Vol. 106, № 2 (Suppl.). – P. S27-S31.
13. First report of a novel LMNA mutation in a Chinese family with limb-girdle muscular dystrophy / G. Hong [et al.] // *J Genet.* – 2014. – Vol. 93, № 3. – P. 843–847.
14. Cardiac features of Emery-Dreifuss muscular dystrophy caused by lamin A/C gene mutations / T. Sanna [et al.] // *Eur Heart J.* – 2003. – Vol. 24, № 24. – P. 2227–2236.
15. Mutation analysis of the lamin A/C gene (LMNA) among patients with different cardiomyopathy phenotypes / M. Vytopil [et al.] // *J Med Genet.* – 2003. – Vol. 40, № 12. – e132.
16. Cardiac effects of the c.1583 C→G LMNA mutation in two families with Emery-Dreifuss muscular dystrophy / I. Zhang [et al.] // *Molecular Medicine Reports.* – 2015. – Vol. 12, № 4. – P. 5065–5071.

L.N. Sivitskaya<sup>1</sup>, T.G. Vaikhanskaya<sup>2</sup>, N.G. Danilenko<sup>1</sup>, T.V. Kurushka<sup>2</sup>, O.G. Davydenko<sup>1</sup>

## MUTATIONS IN *LMNA* GENE LEADING TO LAMIN A/C CONFORMATIONAL CHANGES AND DILATED CARDIOMYOPATHY

<sup>1</sup>Institute of Genetics and Cytology, NAS of Belarus  
Minsk BY-220072, the Republic of Belarus

<sup>2</sup>Republican Scientific and Practical Center of Cardiology  
Minsk BY-220036, the Republic of Belarus

Three cases of laminopathies associated with mutations in the LMNA gene are presented: dilated cardiomyopathy 1A (DCM), limb-grid muscular dystrophy 1B and Emery-Dreifuss muscular dystrophy 2. Diagnoses were established in three unrelated patients based on the complex clinical trial. Sanger sequencing was used to search for mutations in LMNA exons in patient DNA samples. Nucleotide substitutions leading to missense mutations in lamins have been revealed: c.1558T>C (p.W520R), p.1583C>G (p.T528R) and new c.569G>C (p.R190P). The study of proband's relatives determined *de novo* occurrence of mutations. Pedigree analysis revealed that the disease was not previously detected in the patient's family. A comparative analysis of published clinical cases with similar mutations was performed. Differences in onset age and severity of dilated cardiomyopathy were shown for p.T528R and p.R190P carriers.

**Key words:** Lamin A/C, LMNA gene, dilated cardiomyopathy, laminopathies.

Дата поступления статьи: 5 июля 2017 г.

Е.Г. Смирнова<sup>1</sup>, В.Н. Кипень<sup>1,2</sup>, С.Б. Мельнов<sup>3</sup>, А.А. Мохорт<sup>4</sup>

## ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНОВ ГЛУТАТИОН-S-ТРАНСФЕРАЗ ПРИ РАКЕ ПОЧКИ

<sup>1</sup>УО «Международный государственный экологический институт им. А.Д. Сахарова» БГУ  
Республика Беларусь, 220070, г. Минск, ул. Долгобродская, 23/1; e-mail: e.smirnova@tut.by

<sup>2</sup>ГУ «Научно-практический центр Государственного комитета судебных экспертиз  
Республики Беларусь»

Республика Беларусь, 220114, г. Минск, ул. Филимонова 25

<sup>3</sup>Республиканское научно-исследовательское унитарное предприятие «Бел НИЦ «Экология»  
Республика Беларусь, 220095, г. Минск, ул. Г. Якубова, 76

<sup>4</sup>ГУ «Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии  
им. Н.Н. Александрова»

Республика Беларусь, 223040, Минский р-н, п. Лесной-2

Представлены результаты анализа распространенности полиморфизма генов II фазы биотрансформации ксенобиотиков *GSTP1*, *GSTM1*, *GSTT1* у 60 пациентов мужского пола с раком почки и 85 мужчин, не имеющих данного заболевания на момент исследования. Показано, что полиморфный вариант гена *GSTP1* p.I105V ассоциирован с повышенным риском развития рака почки, тогда как для нулевых генотипов по генам *GSTM1* и *GSTT1* такой связи выявлено не было.

**Ключевые слова:** рак почки, факторы внешней среды, гены системы биотрансформации ксенобиотиков, полиморфизм генов *GSTT1*, *GSTM1*, *GSTP1*.

### Введение

В общей структуре всех злокачественных новообразований на долю рака почки (РП) в Республике Беларусь приходится всего 5% от всех случаев вновь выявленных новообразований. Однако в структуре онкоурологических заболеваний РП занимает второе место, уступая только раку простаты (9,2% всех случаев злокачественных новообразований). Кроме того, прослеживается тенденция к устойчивому росту заболеваемости РП: в 2008 г. выявлялось 12 случаев на 100 тыс. всего населения Беларуси, а в 2015 г. почти втрое больше – 26 на 100 тыс. Также значимым является тот факт, что рост заболеваемости начинается с 30-ти лет и сохраняет высокие значения в трудоспособном возрасте (7,2% мужского населения), причем злокачественные новообразования паренхимы почки в Республике Беларусь регистрируются в 2 раза чаще у мужчин, чем у женщин (что соответствует европейским показателям) [1].

Ключевая роль генетических факторов в канцерогенезе очевидна, и к настоящему времени выявлен ряд генетических изменений,

ассоциированных с теми или иными опухолевыми процессами. При РП (как наследственных, так и спорадических формах) таким событием зачастую является инактивация гена *VHL* (Gene NCBI ID:7428) [2]. Однако принадлежность РП к мультифакториальным заболеваниям, в этиопатогенез которых вносят значительный вклад средовые факторы, побуждает выявлять механизмы, реализующие действие неблагоприятных факторов окружающей среды. В Республике Беларусь, где экологические проблемы, свойственные индустриально развитым странам, усугубляются еще и последствиями аварии на Чернобыльской АЭС, данные исследования приобретают особую значимость.

Значительный разрыв в показателях заболеваемости онкопатологией между сельскими и городскими жителями (у последних достоверно выше) ранее объяснялся, отчасти, неравными диагностическими возможностями. Современные методы диагностики и широкий охват скрининговыми мероприятиями, наряду с доступностью их для сельских и городских жителей, существенно не сократили разрыв

в показателях заболеваемости. Данный факт может косвенно указывать на значимый вклад факторов окружающей среды в канцерогенез.

Нивелирование отрицательных эффектов окружающей среды в значительной степени определяется генами системы биотрансформации ксенобиотиков, обеспечивающих нейтрализацию потенциально мутагенных факторов, влияющих на организм. Принимая во внимание тот факт, что большинство экзогенных и эндогенных метаболитов выводится из организма почками, одним из приоритетных направлений молекулярно-генетических исследований этиопатогенеза РП является изучение статуса генов, кодирующих ключевые ферменты данной системы.

Система биотрансформации ксенобиотиков включает большое количество генов, кодирующих ферменты, участвующие в комплексе биохимических реакций детоксикации и биотрансформации экзогенных ксенобиотиков, протекающих в две последовательные фазы. Причем образующиеся в первой фазе – активации – промежуточные метаболиты зачастую обладают более высокой токсичностью, чем исходные вещества, и являются субстратом для ферментов 2-ой фазы – нейтрализации – в ходе которой гидролазы и трансферазы превращают их в водорастворимые, нетоксичные соединения. Особую роль в этой фазе играют глутатион-S-трансферазы (GSTs), которые имеют широкий спектр экспрессии в различных тканях и обладают активностью в отношении большинства ксенобиотиков [3]. Как показано в ряде работ, некоторые полиморфные варианты генов данной системы приводят к снижению их экспрессии, вплоть до полного ее подавления, что и определяет индивидуальные возможности детоксикации ксенобиотиков и чувствительность к ним при наличии негативных факторов внешней среды [4]. Тем не менее, множественность форм ферментов, кодируемых данными генами в совокупности с перекрывающейся субстратной специфичностью и возможностью индукции, способна суммарно восполнить дефект отдельного фермента при оптимальных условиях окружающей среды.

При ухудшении экологической обстановки возрастает этиологическая значимость генов системы биотрансформации ксенобиотиков в

связи с широкой распространенностью их полиморфизма в европейской популяции. Частота полиморфных вариантов генов семейства *GST* на территории центрально-европейского региона колеблется в широких пределах: до 50% – для гена *GSTP1* (NCBI Gene ID: 7421), причем 10–15% составляют гомозиготы [5, 6]; 40–60% для гена *GSTM1* (NCBI Gene ID: 2944) и 15–30% для гена *GSTT1* (NCBI Gene ID: 2952).

Наличие дефектных аллелей оказывает влияние на активность отдельных ферментов и сбалансированность работы всей системы в целом, что проявляется в разной степени предрасположенности к онкологическим заболеваниям под воздействием мутагенных факторов внешней среды.

Целью настоящего исследования явилось изучение частоты распространенности патогенетически значимых полиморфных вариантов генов II фазы биотрансформации ксенобиотиков – *GSTP1*, *GSTT1* и *GSTM1* – у лиц мужского пола с клинически верифицированным диагнозом рака почки.

### Материалы и методы

В исследование были включены 60 пациентов мужского пола белорусской этнической группы с морфологически верифицированным диагнозом РП, получавшие стационарное лечение в РНПЦ «ОМР им. Н.Н. Александрова» (Республика Беларусь) в период 2014–2017 гг. Возрастная медиана для пациентов с РП на момент установления диагноза составила 59 лет (25-ый перцентиль – 49 лет, 75-ый перцентиль – 64 года, возрастной интервал – 35–76 лет). В группу сравнения вошли 85 мужчин без рака почки в анамнезе на момент забора крови, возрастная медиана составила 46 лет (25-ый перцентиль – 39 лет, 75-ый перцентиль – 57 лет, возрастной интервал – 30–80 лет). Группа сравнения соответствовала по полу, возрасту и этническому составу выборке пациентов с РП.

Сбор биологического материала и анкетных данных проводился с соблюдением всех этических норм после получения у участников исследования информированного согласия.

ДНК из замороженных образцов опухолевой ткани выделяли по протоколу, предложенному

J. Wilcockson [7], из образцов периферической крови – методом водно-метанольной экстракции. Определение концентрации ДНК проводилось на спектрофотометре The NanoDrop® ND-1000 (Peqlab, США) с использованием оригинального программного обеспечения ND-1000 V.3.3.0.

Генотипирование делеционных полиморфных вариантов генов *GSTT1* и *GSTM1* (последовательность олигонуклеотидов заимствована из [8]) осуществляли с использованием метода аллель-специфической ПЦР (АС-ПЦР) в режиме реального времени на приборе CFX96 Touch (Bio-Rad, США) в НИЛ молекулярной генетики научного сектора УО «МГЭИ им. А.Д. Сахарова» БГУ. В качестве положительного контроля амплификации использовали регион 1-го экзона гена *VHL* размером 107 п.о. (F-праймер 5'-CCCTACCCAACGCTGCC-3'; R-праймер 5'-GCTTCAGACCGTGCTATCGT-3'). Реакцию амплификации проводили согласно рекомендациям к коммерческому набору Sso Advanced Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad, США). Генотип определяли по наличию/отсутствию характеристических пиков плавления на стадии пост-ПЦР, используя следующий протокол плавления ампликонов: диапазон температуры плавления – 65–95 °С, температурный инкремент – 0,5 °С, время считывания флуоресцентного сигнала – 0,5 с.

Наличие однонуклеотидного полиморфизма (ОНП) p.I105V (rs1695, ген *GSTP1*) определяли методом полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПЦР-ПДРФ) с использованием

эндонуклеазы рестрикции HpyCH4IV (Thermo Fisher, США). Последовательность олигонуклеотидов заимствована из данных Кипеня В.Н. [9]. ПЦР-смесь готовилась в объеме 25 мкл и включала 2,5 мкл 10x буфера, содержащего (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2,5 мкл 10x смеси dNTPs, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, по 5 пмоль прямого и обратного праймеров, 0,01 ед. Taq-полимеразы и 1 мкл ДНК исследуемых образцов. При выполнении работ использовалась камера для вертикального электрофореза FB-VE20-1 (Fisher Biotech, США). Для визуального наблюдения за продвижением проб в геле использовали загрузочный буфер, содержащий бромфеноловый синий.

Последовательности олигонуклеотидов, характеристики ПЦР-продуктов и рестриктов (с указанием температуры отжига праймеров T<sub>a</sub>(°C) и используемых эндонуклеаз рестрикции) представлены в табл. 1.

При сравнении результатов анализа генотипирования в исследуемых группах использовали точный критерий Фишера. Для нахождения различий между номинальными показателями использовали метод  $\chi^2$ , для вычисления которого прибегали к построению таблиц сопряженности. При анализе таблиц сопряженности в случае количества сравниваемых столбцов более 2 вводилась дополнительная корректировка *p*-значения – использовали точный критерий Фишера и метод Монте-Карло.

Статистическая обработка данных проводилась с использованием программ Microsoft Excel (Microsoft Corporation, США) и SPSS v. 20.0 (IBM, США).

Таблица 1

## Последовательности олигонуклеотидов, используемых для ПЦР

Ген, ОНП (rs)	Последовательность олигонуклеотидов, 5'>3'	T <sub>a</sub> , °C	Метод исследования	Размер ампликона (рестриктв), п.н.
<i>GSTP1</i> p.I105V(rs1695)	F 5'-CCTTCCACGCACATCCTCTT-3' R 5'-ATGACCCGTTACTTGGCTGG-3'	60,0	ПДРФ (HpyCH4IV)	AA (455) AG (213, 242, 455) GG (213, 242)
<i>GSTT1</i> null	F 5'-TTCCTTACTGGTCCTCACATCTC-3' R 5'-TCACCGGATCATGGCCAGC-3'	59,0	АС-ПЦР	459 – делеции нет 0 – делеция
<i>GSTM1</i> null	F 5'-GAACTCCCTGAAAAGCTAAAGC-3' R 5'-GTTGGGCTCAAATATACGGTGG-3'	58,0	АС-ПЦР	219 – делеции нет 0 – делеция

Примечание. T<sub>a</sub> – температура отжига праймеров; ПДРФ – полиморфизм длин рестрикционных фрагментов (приведена эндонуклеаза рестрикции); АС-ПЦР – аллель-специфическая ПЦР

### Результаты и обсуждение

Исследования проводились по алгоритму генотипирования по делеционным полиморфным вариантам генов *GSTT1* и *GSTM1* с использованием ПЦР в реальном времени (Real-time PCR) на термоциклере CFX96 Touch (Bio-Rad, США). Схема предполагала наличие двухлокусной ПЦР-системы для каждого полиморфизма: в одной пробирке одновременно амплифицировались участок гена *GSTT1* (459 п.н., фактическая температура плавления ампликона  $T_m = 87,1 \pm 0,5$  °C) или *GSTM1* (219 п.н.,  $T_m = 83,2 \pm 0,4$  °C) при отсутствии соответствующей делеции, а также участок ге-

на *VHL* (107 п.н.,  $T_m = 90,4 \pm 0,5$  °C), который должен амплифицироваться всегда (индикатор специфической амплификации при наличии целевой ДНК).

Примеры соответствующих профилей плавления, наработанных в процессе ПЦР ампликонов для генов *GSTM1* и *GSTT1*, приведены на рис. 1 и 2 соответственно.

Электрофорез продуктов реакции рестрикции для ОНП р.1105V (ген *GSTP1*) осуществляли в 10%-ном неденатурирующем полиакриламидном геле (ПААГ), при соотношении акриламид/бис-акриламид = 29/1, с последующей окраской бромистым этидием (10 мкг/мл) (рис. 3).

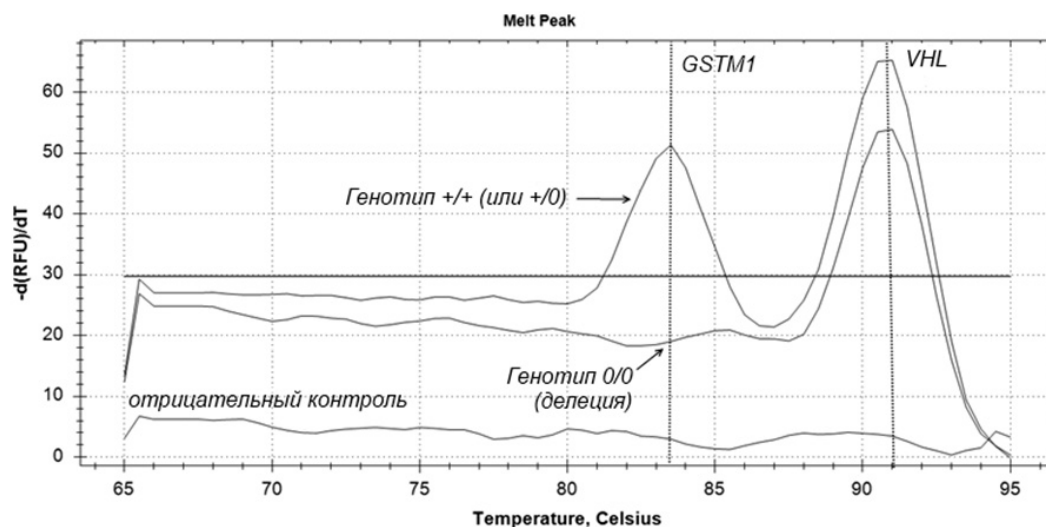


Рис. 1. Профиль плавления ампликонов для генотипирования полиморфизма *GSTM1* null (ген *GSTM1*)

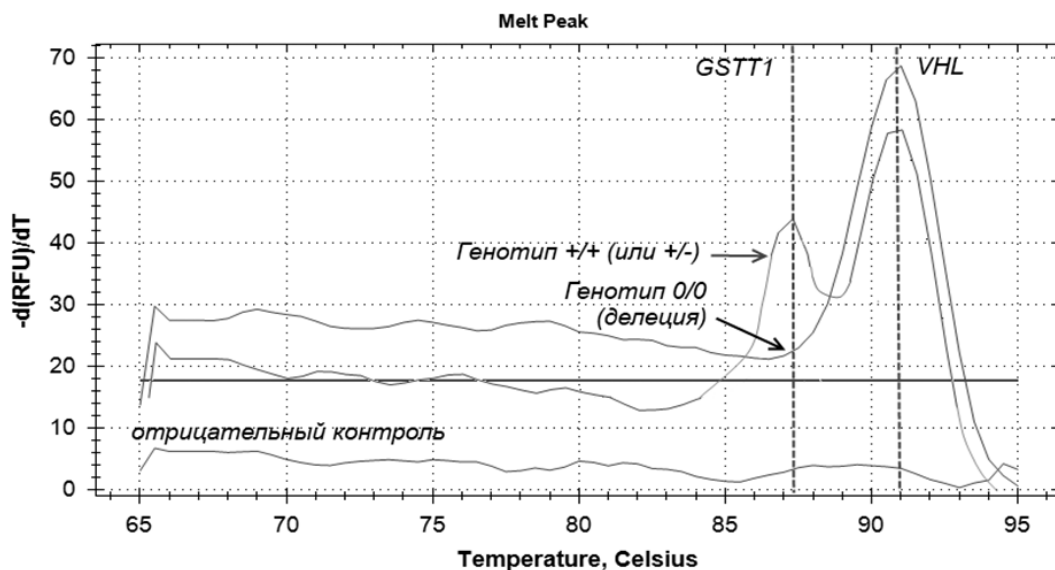


Рис. 2. Профиль плавления ампликонов для генотипирования полиморфизма *GSTT1* null (ген *GSTT1*)

Таким образом, в процессе исследования были определены частоты распространенности генотипов и аллелей для трех полиморфных вариантов: *GSTT1* null, *GSTM1* null и p.I105V (ген *GSTP1*) в группах «Пациенты с РП» и «Группа сравнения», а также проведен статистический анализ с использованием методов  $\chi^2$  или точного критерия Фишера (при ожидаемой частоте  $n \leq 5$ ). Значения частот генотипов и аллелей, а также результаты сравнения представлены в табл. 2.

Как видно из результатов табл. 2, для полиморфного варианта p.I105V (ген *GSTP1*) найдены статистически значимые различия: как генотип GG, так и аллель G чаще встречается среди пациентов с РП. Основываясь на результатах сравнения частот распространенности генотипов по ОНП p.I105V (ген *GSTP1*) в основной группе и группе сравнения, для генотипов/аллелей были рассчитаны значения отношения шансов (ОШ). Так, протективным генотипом (снижающим риск развития РП) является AA (ОШ = 0,42, 95% ДИ = [0,19–0,93],  $p = 0,031$ ), патогенетическим аллелем (соответственно, увеличивающим риск развития РП) – G (ОШ = 2,48, 95% ДИ = [1,23–4,99],  $p = 0,009$ ). Данное заключение справедливо в контексте сравнения генотипов при анализе доминантной модели

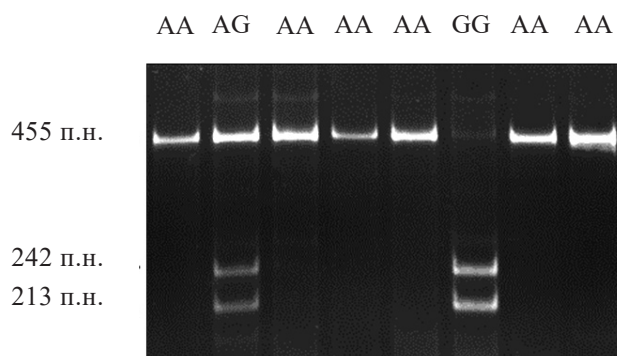


Рис. 3. Результаты ПААГ-электрофореза для ОНП p.I105V (ген *GSTP1*)

наследования – наличие именно аллеля G способно статистически значимо увеличить риск развития РП (табл. 3).

В то же время, делеционные полиморфные варианты генов *GSTM1* и *GSTT1* оказались не связаны с возрастанием риска развития РП.

В настоящее время активно ведутся исследования по выявлению генетических маркеров РП, а также их использования для ранней диагностики, прогноза течения заболевания и определения тактики лечения [6].

Так, к настоящему времени уже выявлена роль отдельных генов системы биотрансформации ксенобиотиков в этиопатогенезе ряда

Таблица 2

Результаты генотипирования по полиморфным вариантам генов семейства GST

Ген, ОНП (rs)	Генотип/аллель	Частота встречаемости, % (абсолют.знач.)		p-уровень
		Пациенты с РП, n = 60	Группа сравнения, n = 85	
<i>GSTP1</i> p.I105V c.313A>G (rs1695)	AA	70,0% (42)	84,9% (73)	0,071
	AG	21,7% (13)	12,8% (11)	
	GG	8,3% (5)	2,3% (2)	
	AA/AG	91,7% (55)	97,7% (83)	0,092
	GG	8,3% (5)	2,3% (2)	
	GG/AG	30,0% (18)	15,1% (13)	<b>0,031</b>
	AA	70,0% (42)	84,9% (73)	
	Аллель A	80,8%	91,3%	
	Аллель G	19,2%	8,7%	
<i>GSTT1</i> null	Del.	23,3% (14)	12,9% (11)	>0,05
	No del.	76,7% (46)	87,1% (74)	
<i>GSTM1</i> null	Del.	40,0% (24)	27,1% (23)	>0,05
	Nodel.	60,0% (36)	72,9% (62)	

Таблица 3

Расчет ОШ для ОНП р.1105V (ген *GSTP1*)

Генотип/аллель	Основная группа	Группа сравнения	$\chi^2$	p-уровень	ОШ	
	n = 60	n = 85			Значение	95% ДИ
AA	0,700	0,849	5,35	0,071	0,42	0,19–0,93
AG	0,217	0,128			1,89	0,78–4,56
GG	0,083	0,023			3,82	0,72–20,38
AA/AG	0,917	0,977	2,79	0,092	0,26	0,05–1,40
GG	0,083	0,023			3,82	0,72–20,38
GG/AG	0,300	0,151	4,68	0,031	2,41	1,07–5,40
AA	0,700	0,849			0,42	0,19–0,93
Аллель А	0,808	0,913			6,81	0,009
Аллель G	0,192	0,087	4,80	1,23–4,99		

заболеваний, в том числе рака желудка и рака легкого [10, 11], миомы матки [12], бронхиальной астмы [13], рака молочной железы [14] и др.

Следует отметить, что результаты, полученные при изучении вклада полиморфных вариантов генов II фазы биотрансформации ксенобиотиков, к которым относятся и глутатион-S-трансферазы (GST), применительно к РП весьма неоднозначны. Убедительных доказательств связи отдельных полиморфных вариантов генов *GSTT1*, *GSTM1* и *GSTP1* с повышенным риском РП для центрально-европейского региона до настоящего времени выявлено не было [15], за исключением делеционного полиморфизма для гена *GSTT1* в азиатской популяции [16]. Однако, данные отдельных исследований указывают, что определенные сочетания патогенетически значимых генотипов для ряда полиморфных вариантов генов семейства GST способны статистически значимо модифицировать (увеличить/уменьшить) риск развития РП. Показано, что сочетание делеционного полиморфизма генов *GSTM1*, *GSTT1* и наличие аллеля G по ОНП р.1105V (ген *GSTP1*) приводит к более, чем 4-х кратному увеличению риска развития РП [17].

### Заключение

В ходе проведенного исследования были определены частоты распространенности полиморфных вариантов *GSTT1* null (ген *GSTT1*), *GSTM1* null (ген *GSTM1*) и р.1105V

(ген *GSTP1*) среди пациентов мужского пола с клинически верифицированным диагнозом РП, а также в группе сравнения в Республике Беларусь и сделаны следующие выводы:

1. При наличии аллеля G по ОНП р.1105V (ген *GSTP1*) риск развития РП увеличивался более, чем в 2 раза относительно среднепопуляционного: ОШ = 4,80 (95% ДИ = [2,07–11,15]); в то же время был выявлен протективный эффект при наличии генотипа AA – ОШ = 0,21 (95% ДИ = [0,08–0,54]), и аллеля А – ОШ = 0,21 (95% ДИ = [0,09–0,48]),  $p < 0,01$ .

2. Делеционные полиморфные варианты в генах *GSTM1* и *GSTT1* не ассоциированы с повышенным риском развития РП в Республике Беларусь.

Таким образом, полиморфный вариант р.1105V гена *GSTP1* II фазы биотрансформации ксенобиотиков ассоциирован с повышенным риском развития РП. В дальнейшем предстоит оценить эффект межгенного взаимодействия генов семейства GST при сочетании наличия патогенетически значимых генотипов по аналогии с алгоритмом, представленным в исследовании Кипеня В.Н. [14].

*Работа выполнена при частичной финансовой поддержке БРФФИ: грант № Б17-090 «Изучение вклада молекулярно-генетических изменений и средового мутагенного давления в онкогенез (на примере рака почки)».*



**Список использованных источников:**

1. Океанов, А.Е. Статистика онкологических заболеваний в Республике Беларусь (2005-2014) = Statistics of Cancer Diseases / А.Е. Океанов, П.И. Моисеев, Л.Ф. Левин; под ред. О.Г. Суконко. – Минск: РНПЦ ОМР им. Н.Н. Александрова, 2015. – С. 25–34.
2. Молекулярно-генетический анализ инактивации гена VHL при спорадическом светлоклеточном раке почки / Д.С. Михайленко [и др.] // Молекулярная биология. – 2008. – Т. 42, № 1. – С. 71–77.
3. Townsend, D.M. The role of glutathione-S-transferase in anti-cancer drug resistance / D.M. Townsend, K.D. Tew // *Oncogene*. – 2003. – 22(47). – P. 7369–7375.
4. Полиморфизм генов системы детоксикации ксенобиотиков, его роль в биотрансформации лекарственных препаратов / А.Г. Мусин [и др.] // Медицинский вестник Башкортостана. – 2014. – Т. 9, № 2. – С. 211–216.
5. I105V polymorphism and promoter methylation of the GSTP1 gene in prostate adenocarcinoma / C. Jerónimo [et al.] // *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. – 2002. – May; 11(5). – P. 445–450.
6. Полиморфизм генов глутатион-S-трансфераз и результаты химиотерапии рака яичников / А.А. Моисеев [и др.] // Вестник РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН. – 2008. – Т. 19, № 1. – С. 59–63.
7. Wilcockson, J. The use of sodium perchlorate in deproteinization during the preparation of nucleic acids (Short Communication) / J. Wilcockson // *Biochem J*. – 1973. – Nov; 135(3). – P. 559–561.
8. Pharm GKB summary – very important tpharmacogene information for GSTT1/Caroline F. Thorn [et al.] // *Pharmacogenet Genomics*. – 2012. – Aug; 22(8). – P. 646–651.
9. Вклад полиморфных вариантов генов II фазы биотрансформации ксенобиотиков (*GSTT1*, *GSTM1*, *GSTP1*, *NAT2*, *EPHX1*) в генез рака молочной железы / В.Н. Кипень [и др.] // *Онкологический журнал*. – 2015. – № 1(33). – С. 49–55.
10. Полиморфизм генов ферментов первой и второй фазы биотрансформации ксенобиотиков у больных раком желудка / С.И. Мартов [и др.] // *Сибирский онкологический журнал*. – 2010. – № 4(40). – С. 30–33.
11. Полиморфизм гена *GSTM1* в группах предрасположенности и резистентности к раку легкого / Е.В. Белогубова [и др.] // *Вопросы онкологии*. – 2000. – Т. 46, № 5. – С. 549–554.
12. Полиморфизм генов *GSTM1*, *GSTT1* и *GSTP1* у женщин с миомой матки / Е.Е. Ступко [и др.] // *Бюллетень ВСНЦ СО РАМН*. – 2010. – № 6(76), Ч. 2. – С. 63–66.
13. Ассоциация полиморфных генов ферментов биотрансформации ксенобиотиков с предрасположенностью к бронхиальной астме у детей с наследственной отягощенностью и без таковой / В.А. Вавилин [и др.] // *Генетика*. – 2002. – Т. 38(4). – С. 539–545.
14. Кипень, В.Н. Роль низкопенетрантных аллелей, предрасполагающих к развитию спорадического рака молочной железы / В.Н. Кипень // *Генетика*. – 2017. – Т. 53, № 7. – С. 838–844.
15. *GSTT1*, *GSTM1*, and *CYP1B1* gene polymorphisms and susceptibility to sporadic renal cell cancer / A.S. Salinas-Sánchez [et al.] // *UrolOncol*. – 2012. – Vol. 30, № 6. – P. 864–870.
16. Relationship between *GSTM1/GSTT1* null genotypes and renal cell carcinoma risk: a meta-analysis / H.Y. Cheng [et al.] // *Ren Fail*. – 2012. – Vol. 34(8). – P. 1052–1057.
17. Impact of glutathione transferase M1, T1, and P1 gene polymorphisms in the genetic susceptibility of North Indian population to renal cell carcinoma / S.T. Ahmad [et al.] // *DNA Cell Biol*. – 2012. – Vol. 31, № 4. – P. 636–643.

E.G. Smirnova<sup>1</sup>, V.N. Kipen<sup>1,2</sup>, S.B. Melnov<sup>3</sup>, A.A. Mokhort<sup>4</sup>

## GLUTATHION-S-TRANSFERASE GENE POLYMORPHISM IN RENAL CANCER

<sup>1</sup>International Sakharov Environmental Institute of Belarusian State University  
Minsk BY-220114, the Republic of Belarus

<sup>2</sup>State Institution “Scientific and Practical Centre of the State Forensic Examination Committee of the  
Republic of Belarus”

Minsk BY-220073, the Republic of Belarus

<sup>3</sup>Republican Research Unitary Enterprise “Belarusian Research Center “Ecology”

Minsk BY-220095, the Republic of Belarus

<sup>4</sup>N.N. Alexandrov National Cancer Centre of Belarus

Lesnoy Minsk District BY-223040, the Republic of Belarus

The results of the analysis of the prevalence of genetic polymorphism in the *GSTP1*, *GSTM1* and *GSTT160* genes of the phase II biotransformation reactions of xenobiotics, in male patients with renal cancer and 85 male patients without renal cancer at the time of the study are presented. It is shown that the p.I105V polymorphism in the *GSTP1* gene is associated with an increased risk of renal cancer development, while for zero gene genotypes *GSTM1* and *GSTT1* genes there was no evidence of such a connection.

**Key words:** renal cancer, environmental factors, genes of the xenobiotics biotransformation system, polymorphism of *GSTT1*, *GSTM1*, *GSTP1* genes.

*Дата поступления статьи: 17 июля 2017 г.*

А.Н. Шаюк<sup>1</sup>, М.Н. Шепетько<sup>2</sup>, Е.П. Михаленко<sup>1</sup>, Н.В. Чеботарёва<sup>1</sup>, Э.В. Крупнова<sup>1</sup>

## РОЛЬ ГЕНОВ МАТРИКСНЫХ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗ *MMP2* И *MMP9* В РАЗВИТИИ И ТЕЧЕНИИ НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНОГО РАКА ЛЕГКОГО

<sup>1</sup>Институт генетики и цитологии НАН Беларуси  
Республика Беларусь, 220072, г. Минск, ул. Академическая, 27  
e-mail: anna.shchayuk@tut.by

<sup>2</sup>Белорусский государственный медицинский университет  
Республика Беларусь, 220116, г. Минск, пр-т Дзержинского, 83

Матриксные металлопротеиназы (ММП) представляют собой протеолитические ферменты, которые способствуют развитию всех этапов канцерогенеза опухоли, включая более поздние стадии инвазии и метастазирования. Полиморфизмы генов *MMP* могут влиять на биологическую функцию этих ферментов и изменять их роль в онкогенезе и прогрессировании. В исследовании проанализирована взаимосвязь полиморфизмов -735C>T (rs2285053), -1575G>A (rs243866) гена *MMP2* и 2660A>G (rs17576) гена *MMP9* с развитием и течением немелкоклеточного рака легкого. Выявлена ассоциация полиморфизма -1575G>A гена *MMP2* с развитием определенного гистологического типа опухоли, наличием отдаленных метастазов и гендерными различиями у пациентов с немелкоклеточным раком легкого.

**Ключевые слова:** немелкоклеточный рак легкого, ангиогенез, матриксные металлопротеиназы, полиморфизм генов *MMP2* и *MMP9*.

### Введение

Рак легкого (РЛ) – одно из самых распространенных злокачественных новообразований, являющееся лидирующей причиной смерти от онкологических заболеваний у мужчин. Рак легкого – гетерогенное заболевание по гистологическим типам. Немелкоклеточный рак легкого (НМРЛ) составляет 85% от всех типов рака. НМРЛ включает несколько гистологических типов: плоскоклеточный (45–65%), аденокарцинома (30–45%), крупноклеточный (5–10%), смешанный тип (до 5%), развитие которых идет разными путями патогенеза, и каждый из которых требует индивидуального подхода к лечению. В связи с развитием персонализированного подхода к лечению пациентов, большое значение имеют исследования молекулярно-генетических особенностей опухоли, которые позволяют прогнозировать развитие и течение этого заболевания для оптимизации индивидуальной противоопухолевой терапии.

Ключевым процессом при развитии НМРЛ является ангиогенез. Важную роль в этом процессе играют матриксные металлопротеиназы (ММП), протеолитические ферменты, которые

способствуют развитию всех этапов канцерогенеза опухоли, включая более поздние стадии инвазии и метастазирования. Полиморфные варианты генов *MMP* могут влиять на биологическую функцию этих ферментов и изменять их роль в онкогенезе [1, 2]. Функция ММП связана с обменом белков межклеточного матрикса и, как следствие, регуляции морфогенеза, ремоделирования тканей, миграции, адгезии, дифференцировки и пролиферации клеток при воспалительных процессах и развитии опухоли [3]. Поэтому изучение нарушений, происходящих в генах металлопротеиназ, поможет более точно прогнозировать развитие определенного гистологического типа НМРЛ. Целью данного исследования является изучение влияния значимых полиморфизмов генов *MMP2* и *MMP9* на развитие и течение НМРЛ.

### Материалы и методы

В исследование включены 213 пациентов с диагнозом НМРЛ (168 мужчин, 45 женщин), проходивших лечение в Минском городском онкологическом диспансере с 2004 по 2017 гг. Гистологический тип опухоли был определен согласно гистологическим критериям ВОЗ.

Исследуемую группу составили пациенты с наиболее часто встречающимися гистологическими типами НМРЛ: 118 человек с плоскоклеточным раком (ПКРЛ) и 95 – с аденокарциномой (АК). Средний возраст пациентов составил  $61,9 \pm 1,2$  года (от 32 до 88 лет). Контрольную группу составили 309 человек (237 мужчин и 72 женщины), соответствующие пациентам по полу, возрасту и сопутствующим заболеваниям. Сбор биологического материала проводился с соблюдением принципов добровольности и конфиденциальности, в соответствии с информированным согласием пациентов.

Выделение тотальной ДНК из периферической крови выполняли методом, описанным С.С. Matthew [4], с последующей фенол-хлороформной экстракцией и очисткой этанолом. Генотипирование полиморфизмов -735C>T (rs2285053), -1575C>T (rs243866) гена *MMP2* и 2660A>G (rs17576) гена *MMP9* осуществляли методом полимеразной цепной реакции и последующим анализом длин рестрикционных фрагментов (ПЦР-ПДРФ) с использованием специфических праймеров и эндонуклеаз рестрикции (табл. 1). Праймеры, использованные в работе, синтезировались ОДО «Праймтех» (Беларусь). Реагенты для ПЦР и ПЦР-ПДРФ использовали производства Thermo Fisher Scientific (Литва). После ПЦР-ПДРФ образцы визуализировали в УФ-свете.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием прикладных программ GraphPad InStat Version 3.05, SPSS Statistics 17.0. и онлайн-программы SNPStats [8]. Для проверки достоверности при сравнении частот генотипов в группах применяли стандартный критерий  $\chi^2$  Пирсона или точ-

ный критерий Фишера для маленьких выборок. Связь между генотипами, развитием и течением заболевания оценивали по отношению шансов (OR (95% CI)) с использованием кодоминантной и доминантной моделей SNPStats. Кодоминантная модель предполагает, что значение пенетрантности гетерозигот лежит между значениями пенетрантности для обеих гомозигот, но зависимость от значений рисков гомозигот неизвестна. Согласно доминантной модели наследования, влияние на пенетрантность проявляется для гетерозигот и гомозигот по предрасполагающему аллелю [9].

### Результаты и обсуждение

В настоящее время большое внимание уделяется изучению молекулярно-биологических маркеров, характеризующих развитие и прогрессирование злокачественных новообразований. Изучаемые полиморфизмы генов *MMP2* и *MMP9* играют существенную роль в ангиогенезе при развитии онкопатологий. В ряде исследований было показано, что присутствие больших количеств активной *MMP2* связано с инвазивным раком молочной железы и карциномой легкого [1, 10–12]. Высокие уровни *MMP9* обеспечивают ангиогенез в инвазивных эпителиальных карциномах и ассоциируют с инвазией опухолевых клеток [13–15]. Известно, что на уровень экспрессии *MMP2* оказывают влияние полиморфизмы -735C>T и -1575G>A, которые расположены в 5'-некодирующей области гена [16, 17]. Наиболее функциональным полиморфизмом *MMP9* является 2660A>G в кодирующей области гена [13].

Таблица 1

Праймеры и эндонуклеазы рестрикции, использованные в работе

Полиморфизм	Праймеры, 5'-3'	Длина продукта, п.н.	Эндонуклеаза рестрикции	Длина ПДРФ-фрагментов, п.н., (аллель)	Источник
<i>MMP2</i> -735C>T	F: ATAGGGTAAACCTCCCCACATT R: GGTAATAATGAGGCTGAGACCTG	300	HinfI	300 (C) 256+46 (T)	[5]
<i>MMP2</i> -1575C>T	F: GTCTGAAGCCCACTGAGACC R: CTAGGAAGGGGGCAGATAGG	175	NlaIII	175 (G) 112+63 (A)	[6]
<i>MMP9</i> 2660A>G	F: AATTCACCCTCCCGCACTCT R: GTTTTGGGGGCCAATACATGA	397	SmaI	397 (A) 224+173 (G)	[7]

На первом этапе нашего исследования был осуществлен поиск ассоциаций полиморфизмов генов *MMP2* и *MMP9* с риском развития НМРЛ в общей группе пациентов (табл. 2). Анализ распределения частоты встречаемости полиморфных вариантов изучаемых генов у пациентов с НМРЛ и контрольной группе не выявил достоверных различий.

На следующем этапе работы пациентов с

НМРЛ разделили на группы по гистологическим характеристикам опухоли, так как активация ангиогенеза АК и ПКРЛ осуществляется посредством передачи сигнала внутрь клетки по различным киназным каскадам (таблица 3). Достоверных различий распределения частоты встречаемости генотипов генов *MMP2* и *MMP9* в контрольной группе и у пациентов с АК и ПКРЛ выявлено не было.

Таблица 2

Распределение частоты встречаемости генотипов генов *MMP2* и *MMP9* в контрольной группе и у пациентов с НМРЛ

Полиморфизм	Контроль	НМРЛ	OR (95% CI)	p
	n, %	n, %		
<b><i>MMP2</i> -735C&gt;T</b>	<b>n = 309</b>	<b>n = 213</b>		
<i>Кодоминантная модель наследования</i>				
CC	239 (77,3)	172 (80,8)	1,00	0,47
CT	66 (21,4)	37 (17,4)	0,78 (0,50–1,22)	
TT	4 (1,3)	4 (1,9)	1,39 (0,34–5,63)	
<i>Доминантная модель наследования</i>				
CC	239 (77,3)	172 (80,8)	1,00	0,35
CT + TT	70 (22,6)	41 (1,9)	0,81 (0,53–1,25)	
<b><i>MMP2</i> -1575G&gt;A</b>	<b>n = 309</b>	<b>n = 213</b>		
<i>Кодоминантная модель наследования</i>				
GG	191 (61,8)	118 (55,4)	1,00	0,31
GA	102 (33,0)	84 (39,4)	1,33 (0,92–1,93)	
AA	16 (5,2)	11 (5,2)	1,11 (0,50–2,48)	
<i>Доминантная модель наследования</i>				
GG	191 (61,8)	118 (55,4)	1,00	0,14
GA+AA	118 (38,2)	95 (44,6)	1,30 (0,91–1,86)	
<b><i>MMP9</i> 2660A&gt;G</b>	<b>n = 309</b>	<b>n = 201</b>		
<i>Кодоминантная модель наследования</i>				
AA	112 (36,2)	71 (35,3)	1,00	0,60
GA	155 (50,2)	108 (53,7)	1,10 (0,75–1,62)	
GG	42 (13,6)	22 (10,9)	0,83 (0,46–1,50)	
<i>Доминантная модель наследования</i>				
AA	112 (36,2)	71 (35,3)	1,00	0,83
GA+GG	197 (63,8)	130 (64,7)	1,04 (0,72–1,51)	

Далее общую группу пациентов с НМРЛ разделили по половому признаку и провели анализ распределения частоты встречаемости полиморфных вариантов изучаемых генов в этих группах (табл. 4). Установлено, что согласно доминантной модели наследования, генотипы -1575GA и -1575AA ге-

на *MMP2* являются рисковыми в развитии НМРЛ у мужчин ( $p = 0,03$ ; OR = 1,56, 95% CI 1,04–2,32). Среди женщин в исследуемой группе достоверных различий распределения частоты встречаемости полиморфных вариантов этого полиморфизма выявлено не было.

Таблица 3

Распределение частоты встречаемости генотипов генов MMP2 и MMP9 в контрольной группе и пациентов с АК и ПКРЛ

Полиморфизм	Контроль	АК	OR (95% CI)	p	ПКРЛ	OR (95% CI)	p
	n, %	n, %			n, %		
<b>MMP2 -735C&gt;T</b>	<b>n = 309</b>	<b>n = 95</b>			<b>n = 118</b>		
<i>Кодоминантная модель наследования</i>							
CC	239 (77,3)	78 (82,1)	1,00	0,43	94 (79,7)	1,00	0,79
CT	66 (21,4)	15 (15,8)	0,70 (0,38–1,29)		22 (18,6)	0,85 (0,49–1,45)	
TT	4 (1,3)	2 (2,1)	1,53 (0,28–8,53)		2 (1,7)	1,27 (0,23–7,06)	
<i>Доминантная модель наследования</i>							
CC	239 (77,3)	78 (82,1)	1,00	0,32	94 (79,7)	1,00	0,6
CT+TT	70 (22,6)	17 (17,9)	0,74 (0,41–1,34)		24 (20,3)	0,87 (0,52–1,47)	
<b>MMP2 -1575G&gt;A</b>	<b>n = 309</b>	<b>n = 95</b>	–		<b>n = 118</b>	–	
<i>Кодоминантная модель наследования</i>							
GG	191 (61,8)	53 (55,8)	1,00	0,57	65 (55,1)	1,00	0,33
GA	102 (33,0)	36 (37,9)	1,27 (0,78–2,07)		48 (40,7)	1,38 (0,89–2,16)	
AA	16 (5,2)	6 (6,3)	1,35 (0,50–3,62)		5 (4,2)	0,92 (0,32–2,61)	
<i>Доминантная модель наследования</i>							
GG	191 (61,8)	53 (55,8)	1,00	0,30	65 (55,1)	1,00	0,21
GA+AA	118 (38,2)	42 (44,2)	1,28 (0,81–2,04)		53 (44,9)	1,32 (0,86–2,03)	
<b>MMP9 2660A&gt;G</b>	<b>n = 309</b>	<b>n = 87</b>	–		<b>n = 114</b>	–	
<i>Кодоминантная модель наследования</i>							
AA	112 (36,2)	33 (37,9)	1,00	0,35	38 (33,3)	1,00	0,82
GA	155 (50,2)	47 (54,0)	1,03 (0,62–1,71)		61 (53,5)	1,16 (0,72–1,86)	
GG	42 (13,6)	7 (8,1)	0,57 (0,23–1,38)		15 (13,2)	1,05 (0,53–2,11)	
<i>Доминантная модель наследования</i>							
AA	112 (36,2)	33 (37,9)	1,00	0,77	38 (33,3)	1,00	0,58
GA+GG	197 (63,8)	54 (62,1)	0,93 (0,57–1,52)		76 (66,7)	1,14 (0,72–1,79)	

Таблица 4

Распределение частоты встречаемости генотипов генов MMP2 и MMP9 среди мужчин и женщин у пациентов с НМРЛ и в контрольной группе

Полиморфизм	Мужчины				Женщины			
	Контроль	НМРЛ	OR (95% CI)	p	Контроль	НМРЛ	OR (95% CI)	p
	n, %	n, %			n, %	n, %		
<b>MMP2 -735C&gt;T</b>	<b>n = 237</b>	<b>n = 168</b>			<b>n = 72</b>	<b>n = 45</b>		
<i>Кодоминантная модель наследования</i>								
CC	182 (62,0)	136 (81,0)	1,00	0,48	57 (79,2)	36 (80,0)	1,00	0,93
CT	52 (21,9)	29 (17,3)	0,75 (0,45–1,24)		14 (19,4)	8 (17,8)	0,90 (0,35–2,37)	
TT	3 (1,3)	3 (1,8)	1,34 (0,27–6,73)		1 (1,4)	1 (2,2)	1,58 (0,10–26,12)	

## Окончание табл. 4

Полиморфизм	Мужчины				Женщины			
	Контроль	НМРЛ	OR (95% CI)	<i>p</i>	Контроль	НМРЛ	OR (95% CI)	<i>p</i>
	n, %	n, %			n, %	n, %		
<i>Доминантная модель наследования</i>								
CC	182 (76,8)	136 (81,0)	1,00	0,31	57 (79,2)	36 (80,0)	1,00	0,91
CT+TT	55 (23,2)	32 (19,1)	0,78 (0,48–1,27)		15 (20,8)	9 (20,0)	0,95 (0,38–2,40)	
<b><i>MMP2</i> -1575G&gt;A</b>	<b>n = 237</b>	<b>n = 168</b>	–		<b>n = 72</b>	<b>n = 45</b>	–	
<i>Кодоминантная модель наследования</i>								
GG	147 (62,0)	86 (51,2)	1,00	0,095	44 (61,1)	32 (71,1)	1,00	0,36
GA	79 (33,3)	72 (42,9)	1,56 (1,03–2,36)		23 (31,9)	12 (26,7)	0,72 (0,31–1,65)	
AA	11 (4,6)	10 (6,0)	1,55 (0,63–3,81)		5 (6,9)	1 (2,2)	0,27 (0,03–2,47)	
<i>Доминантная модель наследования</i>								
GG	147 (62,0)	86 (51,2)	1,00	<b>0,03</b>	44 (61,1)	32 (71,1)	1,00	0,27
GA+AA	90 (38,0)	82 (48,8)	<b>1,56 (1,04–2,32)</b>		28 (38,9)	13 (28,9)	0,64 (0,29–1,42)	
<b><i>MMP9</i> 2660A&gt;G</b>	<b>n = 237</b>	<b>n = 159</b>	–		<b>n = 72</b>	<b>n = 42</b>	–	
<i>Кодоминантная модель наследования</i>								
AA	81 (34,2)	60 (37,7)	1,00	0,57	31 (43,1)	11 (26,2)	1,00	0,17
GA	118 (49,8)	79 (49,7)	0,61 (0,32–1,17)		37 (51,4)	29 (69,0)	2,21 (0,95–5,13)	
GG	38 (16,0)	20 (12,6)	0,27 (0,06–1,29)		4 (5,6)	2 (4,8)	1,41 (0,23–8,80)	
<i>Доминантная модель наследования</i>								
AA	81 (34,2)	60 (37,7)	1,00	0,47	31 (43,1)	11 (26,2)	1,00	0,068
GA+GG	156 (65,8)	99 (62,3)	0,86 (0,56–1,30)		41 (5,6)	31 (73,8)	2,13 (0,93–4,89)	

Анализ ассоциации изучаемых генотипов с развитием ПКРЛ или АК у мужчин и женщин показал, что генотипы -1575GA и -1575AA гена *MMP2* ассоциированы с **возникновением АК именно у мужчин** ( $p = 0,013$ ; OR = 2,09, 95% CI 1,16–3,75) (табл. 5).

У женщин не обнаружено достоверных различий частоты встречаемости полиморфных вариантов изучаемых полиморфизмов между контрольной группой и пациентками с АК и ПКРЛ (табл. 5).

Полиморфизм 1575G>A гена *MMP2* расположен в 5'-некодирующей области в полупалиндромном потенциальном сайте связывания ядерного рецептора NR3A1 [18]. Аллель -1575G функционирует как энхансер и, как следствие, играет важную роль в экспрессии этой металлопротеиназы, тогда как аллель -1575A теряет способность активировать транскрипцию. Это приводит к тому, что

экспрессия фермента снижается. В некоторых исследованиях установлено, что у носителей генотипов -1575GA и -1575AA гена *MMP2* увеличен риск развития рака слюнной железы [6], различных нарушений обмена веществ [19] и сердечно-сосудистых заболеваний [20, 21].

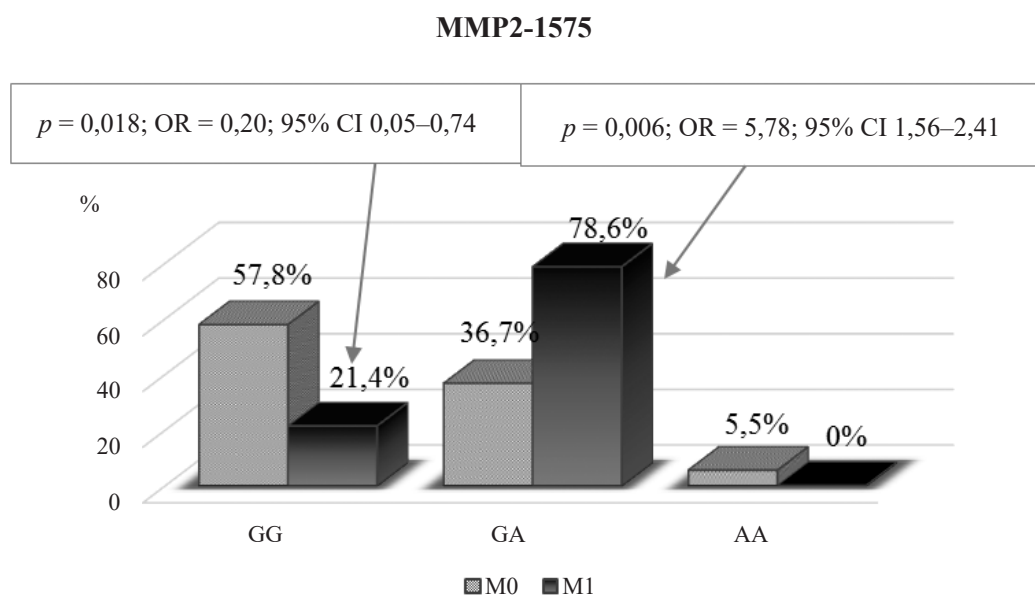
Далее был проведен анализ влияния полиморфизмов изучаемых генов на течение и прогрессирование НМРЛ. В нашем исследовании выявлено, что в общей группе пациентов с НМРЛ генотип -1575GA гена *MMP2* встречается достоверно чаще в 2 раза ( $p = 0,006$ ; OR = 5,78; 95% CI 1,56–21,41), а генотип -1575GG гена *MMP2* – достоверно реже ( $p = 0,018$ ; OR = 0,20, 95% CI 0,05–0,74) у пациентов с отдаленными метастазами (M1), по сравнению с пациентами без метастазов (M0) (рис. 1). Не установлено ассоциации полиморфизмов -735C>T гена *MMP2* и 2660A>G гена *MMP9* с наличием отдаленных метастазов в общей группе пациентов.

Таблица 5

Распределение частоты встречаемости генотипов генов MMP2 и MMP9 среди мужчин и женщин с АК и ПКРЛ

Полиморфизм	Мужчины					Женщины						
	Контроль		АК		OR (95% CI)	p	ПКРЛ		АК		OR (95% CI)	p
	н, %	п, %	н, %	п, %			н, %	п, %	н, %	п, %		
<b>MMP2</b>	<b>n = 237</b>	<b>n = 57</b>										
<b>-735C&gt;T</b>												
<i>Кодоминантная модель наследования</i>												
CC	182 (62,0)	48 (84,2)	1,00	0,38	1,00	0,76	57 (79,2)	30 (79,0)	1,00	1,00	0,85	
CT	52 (21,9)	8 (14,0)	0,58 (0,26-1,31)		0,84 (0,47-1,47)	0,76	14 (19,4)	7 (18,4)	0,95 (0,35-2,61)	0,9	0,68 (0,08-6,10)	
TT	3 (1,3)	1 (1,8)	1,26 (0,13-12,42)		1,38 (0,23-8,40)		1 (1,4)	1 (2,6)	1,90 (0,11-31,46)	0 (0,0)	—	
<i>Доминантная модель наследования</i>												
CC	182 (76,8)	48 (84,2)	1,00	0,21	1,00	0,6	57 (79,2)	30 (79,0)	1,00	1,00	0,67	
CT+TT	55 (23,2)	9 (15,8)	0,62 (0,29-1,34)		0,86 (0,50-1,50)	0,6	15 (20,8)	8 (21,1)	1,01 (0,39-2,66)	0,98	0,63 (0,07-5,67)	
<b>MMP2</b>	<b>n = 237</b>	<b>n = 57</b>					<b>n = 72</b>	<b>n = 38</b>				
<b>-1575G&gt;A</b>												
<i>Кодоминантная модель наследования</i>												
GG	147 (62,0)	25 (43,9)	1,00	0,041	1,00	0,42	44 (61,1)	28 (73,7)	1,00	1,00	0,56	
GA	79 (33,3)	27 (47,4)	<b>2,01 (1,09-3,69)</b>		1,37 (0,86-2,20)	0,42	23 (31,9)	9 (23,7)	0,61 (0,25-1,52)	0,34	1,43 (0,30-6,96)	
AA	11 (4,6)	5 (8,8)	1,55 (0,63-3,81)		1,10 (0,37-3,29)		5 (6,9)	1 (2,6)	0,31 (0,03-2,83)	0 (0,0)	—	
<i>Доминантная модель наследования</i>												
GG	147 (62,0)	25 (43,9)	1,00	<b>0,013</b>	1,00	0,21	44 (61,1)	28 (73,7)	1,00	1,00	0,84	
GA+AA	90 (38,0)	32 (56,1)	<b>2,09 (1,16-3,75)</b>		1,34 (0,85-2,11)	0,21	28 (38,9)	10 (26,3)	0,56 (0,24-1,33)	0,18	1,18 (0,25-5,67)	
<b>MMP9</b>	<b>n = 237</b>	<b>n = 57</b>					<b>n = 72</b>	<b>n = 35</b>				
<b>2660A&gt;G</b>												
<i>Кодоминантная модель наследования</i>												
AA	81 (34,2)	23 (44,2)	1,00	0,28	1,00	0,89	31 (43,1)	10 (28,6)	1,00	1,00	0,16	
GA	118 (49,8)	24 (46,1)	0,72 (0,38-1,36)		1,02 (0,62-1,69)	0,89	37 (51,4)	23 (65,7)	1,93 (0,80-4,66)	0,33	5,03 (0,57-44,04)	
GG	38 (16,0)	5 (9,6)	0,27 (0,06-1,29)		0,86 (0,42-1,76)		4 (5,6)	2 (5,7)	1,55 (0,25-9,77)	0 (0,0)	—	
<i>Доминантная модель наследования</i>												
AA	81 (34,2)	23 (44,2)	1,00	0,18	1,00	0,94	31 (43,1)	10 (28,6)	1,00	1,00	0,11	
GA+GG	156 (65,8)	29 (55,8)	0,65 (0,36-1,20)		0,98 (0,61-1,59)	0,94	41 (5,6)	25 (71,4)	1,89 (0,79-4,51)	0,18	4,54 (0,52-39,65)	



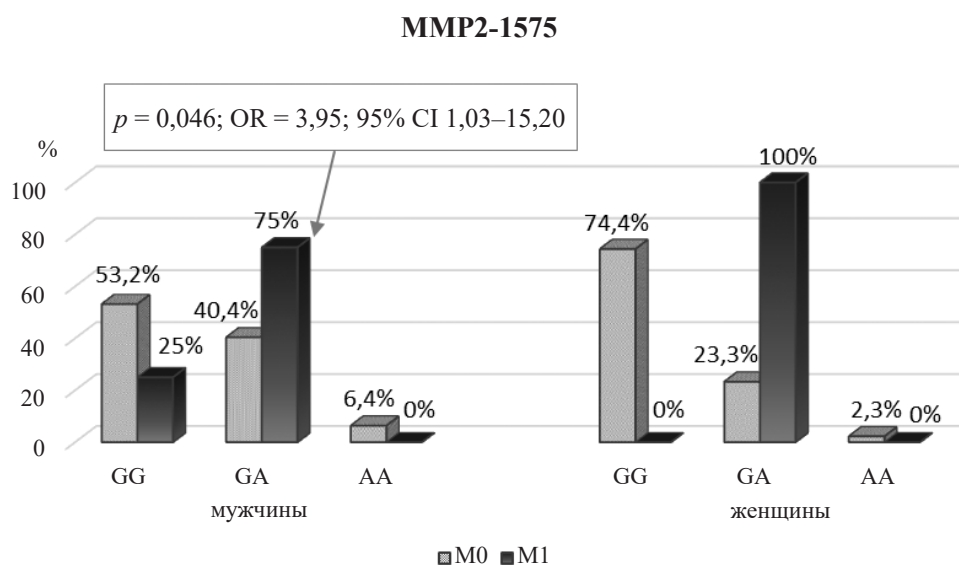


**Рис. 1.** Распределение частот генотипов полиморфизма -1575G>A гена *MMP2* у пациентов с отдаленными метастазами (M1) и без метастазов (M0)

При разделении общей группы пациентов по гендерному признаку выявлено, что эта зависимость сохраняется: у мужчин генотип -1575GA гена *MMP2* встречается у 75% пациентов с отдаленными метастазами и 40,4% пациентов без метастазов ( $p = 0,046$ ; OR = 3,95, 95% CI 1,03–15,20). Среди женщин только две пациентки имели отдаленные метастазы и обе являлись носителями генотипа -1575GA (рис. 2). Следовательно, наличие генотипа

-1575GA гена *MMP2* является рисковым в возникновении отдаленных метастазов у пациентов с НМРЛ.

*MMP2* обеспечивает процесс неоваскуляризации при развитии опухоли благодаря своей способности расщеплять коллаген базальных мембран сосудов. Доказана важность продукции *MMP2* для реализации инвазии опухолевыми клетками. Некоторыми исследователями было показано, что присутствие больших коли-



**Рис. 2.** Распределение частот генотипов полиморфизма -1575G>A гена *MMP2* у пациентов с отдаленными метастазами (M1) и без метастазов (M0) в зависимости от пола

чество активной MMP2 связано с инвазивным раком молочной железы и карциномой легкого [12–17]. Согласно литературным данным, выявлена корреляция между экспрессией MMP2 и наличием метастазов в лимфатических узлах у больных раком гортани [22]. Следовательно, продукция MMP2 опухолевыми клетками обеспечивает их инвазивный потенциал.

### Заключение

В исследуемой группе пациентов с НМРЛ было выявлено, что полиморфизм 1575G>А гена *MMP2* играет важную роль в развитии и прогрессировании данного заболевания. У мужчин генотипы -1575GA и -1575AA этого гена ассоциированы с развитием такого гистологического типа рака, как аденокарцинома легкого. Генотип -1575GA ассоциирован с возникновением метастазов в отдаленных от первичного опухолевого очага органах у пациентов с немелкоклеточным раком легкого. Таким образом, носители аллеля -1575А находятся в группе риска развития аденокарциномы и отдаленных метастазов. Следовательно, MMP2 обеспечивает ангиогенез в процессе развития НМРЛ, способствует инвазии опухолевых клеток и развитию метастазов.

### Список использованных источников

1. Matrix metalloproteinase-2 promoter polymorphism is associated with breast cancer in a Mexican population / I. Delgado-Enciso [et al.] // *Gynecol Obstet Invest.* – 2008. – Vol. 65. – P. 68–72.
2. Matrix metalloproteinase 2 (MMP2) protein expression and laryngeal cancer prognosis: a meta analysis / R-R. Liu [et al.] // *International Journal of Clinical and Experimental Medicine.* – 2015. – Vol. 8, № 2. – P. 2261–2266.
3. Functional polymorphism in the regulatory region of gelatinase B gene in relation to severity of coronary atherosclerosis / B. Zhang [et al.] // *Circulation.* – 1999. – Vol. 99. – P. 1788–1794.
4. Mathew, C.C. The isolation of high molecular weight eucaryotic DNA / C.C. Mathew // *Methods in Molecular Biology.* – Clifton: Human Press. – 1984. – Vol. 2, № 4. – P. 31–34.
5. Polymorphisms in MMP Family and TIMP Genes and Carotid Artery Intima-Media Thickness / C. Armstrong [et al.] // *Stroke.* – 2007. – Vol. 38. – P. 2895–2899.
6. The MMP-2 and MMP-9 promoter polymorphisms and susceptibility to salivary gland cancer / M. Radunovic [et al.] // *JBUON.* – 2016. – Vol. 21, № 3. – P. 597–602.
7. Association study of polymorphisms within matrix metalloproteinase 9 with bronchial asthma/ K. Ganter [et al.] // *International Journal of Immunogenetics.* – 2005. – Vol. 32. – P. 233–236.
8. SNPStats: Your web tool for SNP analysis. [Electronic resource]. – Mode of access: <http://bioinfo.iconcologia.net/snpstats/start.htm>. – Date of access: 07.09.2017.
9. SNPStats: a web tool for the analysis of association studies / X. Sole [et al.] // *Bioinformatics.* – 2006. – Vol. 22. – P. 1928–1929.
10. Sadeghi, M. MMP-9 promoter polymorphism associated with tumor progression of breast cancer in Iranian population *International Journal of Integrative Biology.* – 2009. – Vol. 6, № 1. – P. 33–37.
11. Genetic polymorphism of matrix metalloproteinases in breast cancer / E. Wiczorek [et al.] // *Neoplasma.* – 2012. – Vol. 59, № 3. – P. 237–247.
12. Influence of MMP-2 and MMP-9 promoter polymorphisms on gene expression and clinical outcome of non-small cell lung cancer / J. Rollin [et al.] // *Lung Cancer.* – 2007. – Vol. 56, № 2. – P. 273–280.
13. Price, S.J. Identification of novel, functional genetic variants in the human matrix metalloproteinase-2 gene: role of Sp1 in allele specific transcriptional regulation / S.J. Price, D.R. Greaves, H. Watkins // *J Biol Chem.* – 2001. – Vol. 276. – P. 7549–7558.
14. Genetic polymorphisms in MMP 2, 9 and 3 genes modify lung cancer risk and survival / P. González-Arriaga [et al.] // *BMC Cancer.* – 2012. – Vol. 12, № 121. – doi: 10.1186/1471-2407-12-121.
15. Putative functional polymorphisms of MMP9 predict survival of NSCLC in a Chinese population / G. Jin [et al.] // *Int J Cancer.* – 2009. – Vol. 124, № 9. – P. 2172–2178.
16. Meta-analysis of association between matrix metalloproteinases 2, 7 and 9 promoter polymorphisms and cancer risk / B. Peng [et al.] // *Mutagenesis.* – 2010. – Vol. 25. – P. 371–379.
17. Jezierska, A. Matrix metalloproteinase-2 involvement in breast cancer progression: a

mini-review / A. Jezierska, T. Motyl // *Med Sci Monit.* – 2009. – Vol. 15, № 2. – P. 32–40.

18. Analysis of *MMP2* promoter polymorphisms in childhood obesity / A.R. Morgan [et al.] // *BMC Res Notes.* – 2011. – Vol. 4, № 253. – doi: 10.1186/1756-0500-4-253.

19. Genetic variants of matrix metalloproteinase (*MMP2*) gene influence metabolic syndrome susceptibility / S.S. Yadav [et al.] // *Genet Test Mol Biomarkers.* – 2014. – Vol. 18. – P. 88–92.

20. Variants of the matrix metalloproteinase-2 but not the matrix metalloproteinase-9 genes significantly influence functional outcome after

stroke [Electronic resource] / H. Manso [et al.] // *BMC Med Genet.* – 2010. – Vol. 11, № 40. – Mode of access: <http://www.biomedcentral.com/content/pdf/1471-2350-11-40.pdf>. – Date of access: 07.09.2017.

21. Inflammatory cytokine gene variants in coronary artery disease patients in Greece / A. Manginas [et al.] // *Coronary Artery Disease.* – 2008. – Vol. 19, № 8. – P. 575–582.

22. Matrix metalloproteinase 2 (*MMP2*) protein expression and laryngeal cancer prognosis: a meta analysis / R-R. Liu [et al.] // *International Journal of Clinical and Experimental Medicine.* – 2015. – Vol. 8, № 2. – P. 2261–2266.

A.N. Shchayuk<sup>1</sup>, M.N. Shapetska<sup>2</sup>, A.P. Mikhalenka<sup>1</sup>, N.V. Chebotareva<sup>1</sup>, E.V. Krupnova<sup>1</sup>

## ROLE OF MATRIX METALLOPROTEINASES' GENES *MMP2* AND *MMP9* IN THE DEVELOPMENT AND PROGRESSION OF NON-SMALL CELL LUNG CANCER

<sup>1</sup>Institute of Genetics and Cytology, NAS of Belarus  
Minsk BY-220072, the Republic of Belarus

<sup>2</sup>Belarusian State Medical University  
Minsk BY-220116, the Republic of Belarus

Matrix metalloproteinases (MMPs) are proteolytic enzymes that contribute to all stages of tumour progression, including the later stages of invasion and metastasis. Genetic polymorphisms in the *MMP* genes may influence the biological function of these enzymes and change their role in carcinogenesis and progression. The study analyzed the relationship between polymorphisms –735C>T (rs2285053), –1575G>A (rs243866) of *MMP2* gene and 2660A>G (rs17576) of *MMP9* gene and the development and progression of non-small cell lung cancer. The association of polymorphism –1575G>A of the *MMP2* gene with the development of a specific histological type of tumor was revealed, the presence of distant metastases and gender differences in patients with non-small cell lung cancer.

**Key words:** non-small cell lung cancer, angiogenesis, matrix metalloproteinases, polymorphism of the *MMP2* and *MMP9* genes.

Дата поступления статьи: 20 сентября 2017 г.

И.Н. Ильюшёнко<sup>1</sup>, Е.П. Гунько<sup>1</sup>, М.Л. Антонович<sup>1</sup>, Н.Н. Яцков<sup>1</sup>, А.М. Кустанович<sup>2</sup>,  
А.Ю. Сухаревский<sup>3</sup>, В.В. Скакун<sup>1</sup>, В.В. Гринев<sup>1</sup>

## ИЗУЧЕНИЕ ЗАКОНОМЕРНОСТЕЙ СПЛАЙСИНГА РНК ГИБРИДНОГО ОНКОГЕНА *RUNX1-RUNX1T1* ЧЕЛОВЕКА С ПОМОЩЬЮ МЕТОДОВ ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОГО АНАЛИЗА ДАНЫХ И ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ

<sup>1</sup>Белорусский государственный университет

Республика Беларусь, 220030, г. Минск, пр. Независимости, 4; e-mail: nov.ilyushonok@gmail.com

<sup>2</sup>Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии  
Республика Беларусь, 223053, Минский р-н, д. Боровляны, ул. Фрунзенская, 43

<sup>3</sup>Institute of Cell Biology, Edinburgh University  
Darwin Building, The King's Buildings EH9 3BF, Edinburgh, UK

Гибридный онкоген *RUNX1-RUNX1T1* является одним из факторов инициации и формирования острого миелоидного лейкоза у детей и взрослых. Данный онкоген кодирует более 130 изоформ РНК, закономерности образования которых до конца не установлены. В представленной работе были найдены ассоциативные правила комбинаторики экзонов изучаемого онкогена, смоделирована структура новых, пока не известных, транскриптов и проведен их экспериментальный поиск с помощью стандартных, а также высокопроизводительных молекулярно-генетических методов.

**Ключевые слова:** гибридный онкоген *RUNX1-RUNX1T1*, сплайсинг РНК, интеллектуальный анализ данных, высокопроизводительное секвенирование.

### Введение

Сбалансированная негомологичная транслокация t(8;21) является часто встречающейся генетической аномалией у больных острым миелоидным лейкозом (ОМЛ) [1]. В результате транслокации образуется онкоген *RUNX1-RUNX1T1*, последовательность которого кодирует белок, состоящий из связывающего ДНК домена Runt транскрипционного регулятора *RUNX1* на N-конце и фактически полноразмерного репрессора транскрипции *RUNX1T1* на C-конце. Данный онкоген вовлечён в функционирование регуляторных сетей, обеспечивающих процессы малигнизации гемопоэтических стволовых/прогениторных клеток человека [2], однако детально механизм такого лейкозогенеза не изучен. В частности, остается открытым вопрос о кодирующем потенциале изучаемого онкогена и причинах, приводящих к избирательной реализации такого потенциала.

Чтобы ответить на этот вопрос, мы использовали комбинированный подход, основанный на методах интеллектуального анализа данных и компьютерного моделирования с последующей

экспериментальной верификацией полученных аналитических результатов. Полученные нами данные говорят о потенциальной эффективности совместного использования моделей на основе экзонных графов и технологий высокопроизводительного секвенирования в поиске неизвестных на данный момент альтернативных транскриптов и изучении закономерностей их формирования. Одновременно с этим наши результаты говорят о том, что мы приблизились к пределу аналитических и экспериментальных возможностей по обнаружению новых изоформ РНК изучаемого онкогена *RUNX1-RUNX1T1*.

### Материалы и методы

*Реконструкция графа сплайсинга онкогена *RUNX1-RUNX1T1**

Концепция графов сплайсинга была сформулирована S. Heber с соавт. в 2002 году [3]. Она была предложена как альтернатива линейным моделям структурной организации генов эукариот и успешно использована для решения ряда задач в области биологии РНК. Методика реконструкции графа сплайсинга онкогена

*RUNXI-RUNXIT1* была описана ранее [4].

#### *Моделирование разнообразия вариантов РНК онкогена RUNXI-RUNXIT1*

Задача моделирования – сгенерировать теоретически ожидаемые изоформы РНК на основе данных об экспериментально подтвержденных транскриптах изучаемого гена. В свою очередь, результаты моделирования нам нужны были для предсказания новых транскриптов, пока еще не обнаруженных экспериментально, а также для изучения закономерностей сплайсинга РНК онкогена *RUNXI-RUNXIT1* путем сравнения экспериментально обнаруженных и теоретически ожидаемых изоформ РНК. Задача моделирования решалась нами путем извлечения из реконструированного графа сплайсинга онкогена *RUNXI-RUNXIT1* всех путей (транскриптов) через полный обход графа. При этом каждый из путей мог начинаться только одним из экспериментально обнаруженных 5'-концевых экзонов и заканчиваться одним из реальных 3'-концевых экзонов. В итоге мы получили 43 353 уникальных варианта путей. Из них 134 варианта путей соответствуют экспериментально обнаруженным транскриптам, а остальные являются гипотетическими транскриптами, существование которых в лейкозных клетках, исходя из структуры графа сплайсинга, теоретически возможно.

#### *Алгоритмы поиска ассоциативных правил*

Алгоритмы поиска ассоциативных правил – большое семейство методов интеллектуального анализа данных, позволяющее находить закономерности между связанными, порой неочевидно, событиями в большом наборе данных. В настоящей работе использовались девять алгоритмов поиска правил: Apriori, AprioriTid, AprioriHybrid, Eclat, FPG, PARTITION, SPADE, GSP и PrefixSpan [5].

С помощью данных алгоритмов путем анализа структуры экспериментально обнаруженных транскриптов онкогена *RUNXI-RUNXIT1* формулировались ассоциативные правила, описывающие наиболее значимые и устойчивые комбинации экзонов. Эти правила имеют вид: «если (условие), то (результат)», где условием является один или несколько экзонов из всего множества экзонов, принадлежащих изучаемому онкогену. Далее найденные правила последовательно применялись к списку теоретически предсказанных изоформ РНК,

тем самым оставляя в нем только те варианты, которые содержат комбинации экзонов, соответствующие правилам.

#### *Синтез комплементарной ДНК и ПЦР*

Тотальная РНК из клеток линии Kasumi-1 выделялась с помощью TRIzol™ Reagent (ThermoFisher Scientific, Литва), после чего использовалась для синтеза первой цепи комплементарной ДНК с помощью RevertAid Reverse Transcriptase (ThermoFisher Scientific, Литва). Дальнейшая постановка ПЦР с применением DreamTaq DNA Polymerase (ThermoFisher Scientific, Литва) осуществлялась по стандартной методике. Ампликоны разделяли с помощью электрофореза в 1%-ном агарозном геле, продукты визуализировали путем окрашивания бромистым этидием и фотографировали.

#### *Получение коротких экспрессированных, а также EST-последовательностей*

Комплементарная ДНК онкогена *RUNXI-RUNXIT1*, полученная методом обратной транскрипции на тотальной клеточной РНК из модельной клеточной линии Kasumi-1, амплифицировалась с помощью ПЦР, ампликоны разделялись путём агарозного или полиакриламидного гель-электрофореза, выделялись из геля и очищались. Секвенирующую реакцию осуществляли с использованием готовой смеси реагентов BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, США), после чего проводился капиллярный электрофорез и детекция полученных продуктов терминации с помощью прибора GeneticAnalyzer ABI 3130 (Hitachi, Япония). Все манипуляции выполнялись согласно рекомендациям фирм-производителей оборудования и реактивов.

Благодаря описанному выше прямому секвенированию ампликонов нам удалось найти 39 уникальных коротких экспрессированных последовательностей РНК онкогена *RUNXI-RUNXIT1*. Кроме того, мы провели поиск EST-последовательностей интересующего нас онкогена в базах данных PubMed, GenBank и ChimerDB 2.0, что расширило их общий список до 46 наименований. Из этих последовательностей 30 имеют структуру, отличающуюся от структуры каких-либо полноразмерных РНК изучаемого онкогена и, как следствие, являются маркерами неизвестных научной обществу изоформ РНК онкогена *RUNXI-RUNXIT1*.

«Прицельный» RNA-Seq и идентификация сайтов альтернативного полиаденилирования

Выделение тотальной РНК из клеток линии Kasumi-1, а также синтез комплементарной ДНК проводили согласно описанному выше протоколу. В качестве затравки для синтеза комплементарной ДНК применялся олиго(dT)-праймер, содержащий два вырожденных нуклеотида на 3'-конце. Полученная ДНК-матрица использовалась в серии ПЦР с праймерами к экзонам E11, E15a, E16, E17a и E17 изучаемого онкогена в качестве прямых и упомянутым выше олиго(dT)-праймером в качестве обратного праймера. Полученные ампликоны секвенировали с помощью геномного секвенатора Illumina MiSeq по стандартному протоколу (Illumina Inc., США). Триминг адаптеров осуществлялся с помощью Trimmomatic v.0.36 [6]. Идентификация потенциальных точек полиаденилирования осуществлялась с помощью программного пакета KLEAT 2.0 [7].

Сборка полноразмерных РНК онкогена *RUNXI-RUNXIT1* из коротких прочтений РНК

Для сборки полноразмерных молекул РНК *RUNXI-RUNXIT1* мы использовали RNA-Seq прочтения, полученные на материале модельной клеточной линии Kasumi-1. Предобработанные прочтения в формате FASTQ были загружены из репозитория European Nucleotide Archive (исследование PRJNA236604) и включали три независимых экспериментальных повтора для клеток, обработанных либо неактивными, либо анти-*RUNXI-RUNXIT1* специфичными короткими интерферирующими РНК. Прочтения картировались на последовательность деривата хромосомы 8 человека с помощью алгоритма Subjunc [8].

Сборка полноразмерных РНК осуществлялась с помощью Cufflinks v.2.2.1 [9] со стандартными настройками, за исключением параметра "Min-isoform-fraction", который был обнулён для повышения чувствительности к минорным альтернативным транскриптам. Согласно рекомендациям разработчиков, сборка осуществлялась независимо для каждого из экспериментальных повторов.

Собранные транскрипты были подвергнуты фильтрации по следующим критериям: количество экзонов  $>1$ , длина экзонов  $>25$  п.о., длина интронов  $>50$  п.о., длина собранной РНК  $>300$  п.о. Для этого использовался ори-

гинальный R код filtrTrans (<https://github.com/VGrinev/transcriptome-analysis/tree/master/TranscriptsFeatures>). Из оставшихся РНК вручную были удалены дубликаты транскриптов, а также РНК, содержащие не подтверждённые прочтениями сплайсинговые события, после чего каждому варианту РНК было присвоено уникальное имя. Оценка количества прочтений, подтверждающих сплайсинговое событие, производилась с помощью программы Integrative Genomics Viewer [10].

Нуклеотидные последовательности реконструированных РНК экстрагировались с помощью утилиты gffread, являющейся частью Cufflinks. Эти сиквенсы, а также исходные FASTQ файлы передавались программе Salmon [11] для оценки уровней экспрессии РНК. Идентификация открытых рамок считывания и кодируемых ими белковых последовательностей осуществлялась с помощью оригинального R кода ORFIndeR (<https://github.com/VGrinev/transcriptome-analysis/tree/master/TranscriptsFeatures>). Функциональная аннотация таких белков была проведена с помощью баз данных NCBI Conserved Domains и InterPro [12].

## Результаты и обсуждение

На сегодняшний момент известно, что онкоген *RUNXI-RUNXIT1* кодирует более 130 вариантов РНК, являясь одним из наиболее продуктивных в этом плане генов человека. При этом предел разнообразия его РНК окончательно не установлен. Кроме того, хотя и были идентифицированы некоторые детерминанты сплайсинга РНК этого онкогена [4], тем не менее, полной расшифровки закономерностей формирования зрелых изоформ кодируемых им молекул РНК до сих пор нет.

Чтобы добиться прогресса в вышеобозначенных вопросах, мы воспользовались двухэтапным подходом, включающим в себя как компьютерное моделирование и глубокий анализ имеющихся данных, так и экспериментальную верификацию полученных аналитических результатов. На аналитическом этапе было проведено моделирование теоретически ожидаемого разнообразия молекул РНК онкогена *RUNXI-RUNXIT1*, где были использованы накопленные к настоящему моменту экспериментальные данные о транскриптах этого онкогена, а также обход графа.

Моделирование предсказывает огромное разнообразие транскриптов у онкогена *RUNXI-RUNXIT1*. Так, полный обход графа сплайсинга изучаемого онкогена порождает 43 353 варианта РНК. Очевидно, что полная экспериментальная проверка их существования в клетке не представляется возможной. Поэтому мы воспользовались методами интеллектуального анализа данных, чтобы сократить полный список предсказываемых транскриптов до минимально возможного, причем включающего наиболее вероятные кандидатуры. Для этого в экспериментально обнаруженных транскриптах с помощью алгоритмов поиска ассоциативных правил были найдены наиболее значимые ассоциации экзонов, которые в дальнейшем и были использованы при отборе кандидатур.

Из девяти апробированных алгоритмов поиска ассоциативных правил мы, в конечном итоге, остановились на двух разных, но наиболее эффективных алгоритмах – Apriori и SPADE. Первый из них учитывает нестрогий порядок экзонов, допускающий вставки экзонов между соседними экзонами. Такого рода ассоциации представляют особый интерес в контексте изучения скоординированного сплайсинга удаленных экзонов [13]. Второй алгоритм учитывает строгий порядок экзонов и позволяет найти тесные ассоциации между соседними экзонами, кодирующими, например, отдельные функциональные домены белка [14].

Оба алгоритма позволяют сформулировать большое количество ассоциативных правил с разным уровнем полезности. Для оценки полезности правил мы использовали три критерия (рис. 1): поддержка, достоверность и улучшение правила. Поддержка правила показывает, какова доля транскриптов поддерживает данное правило. Достоверность правила отражает вероятность того, что из наличия в транскрипте одного набора экзонов следует наличие в нем другого набора экзонов, а улучшение правила оценивает полезнее ли правило случайного угадывания.

Примеры правил, найденных с помощью алгоритма Apriori, представлены в табл. 1. В этой таблице условия правил (если присутствует такой-то экзон или группа экзонов) разделены запятой, а следствие (что какой-либо экзон или группа экзонов следуют далее) указано после знака  $\triangleright$ . Кроме того, в таблице даны числовые характеристики правил, в частности, уровень поддержки правила.

Последовательное применение ассоциативных правил к теоретически ожидаемым транскриптам, найденным с помощью алгоритмов Apriori и SPADE, позволило снизить количество таких транскриптов до 35 и 291 изоформ, соответственно. Примеры прошедших фильтрацию транскриптов представлены в табл. 2. В этой таблице структура транскриптов записана в виде последовательности экзонов, номенклатура которых приведена в работе [4].

Чтобы выяснить, насколько подобна структура транскриптов, отобранных из теоретически предсказанных изоформ РНК, структуре экспериментально подтвержденных вариантов РНК онкогена *RUNXI-RUNXIT1*, рассчитывались попарные расстояния Левенштейна [15] между ними. Для удобства графического отображения полученных расстояний проводилось многомерное шкалирование с помощью метода главных координат [16]. Результаты представлены на рис. 2.

Как можно видеть, при сравнении структуры экспериментальных и теоретически предсказанных транскриптов онкогена *RUNXI-RUNXIT1* мы не можем четко разделить эти группы молекул РНК, хотя внутри каждой группы и выделяются два кластера. Однако транскрипты можно ранжировать по степени похожести на определенную экспериментальную изоформу РНК или на некий усредненный вариант экспериментально обнаруженных РНК. Более того, теоретически предсказанные транскрипты, отобранные с помощью ассоциативных

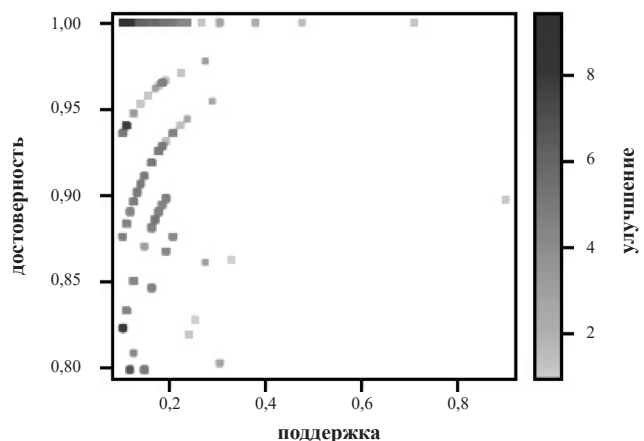


Рис. 1. Распределение по полезности 100 ассоциативных правил сочетания экзонов, полученных с использованием алгоритма Apriori на экспериментально подтвержденных транскриптах онкогена *RUNXI-RUNXIT1*

Таблица 1

Примеры ассоциативных правил, полученных с помощью алгоритма Apriori на выборке экспериментально подтвержденных изоформ РНК онкогена *RUNXI-RUNX1T1*

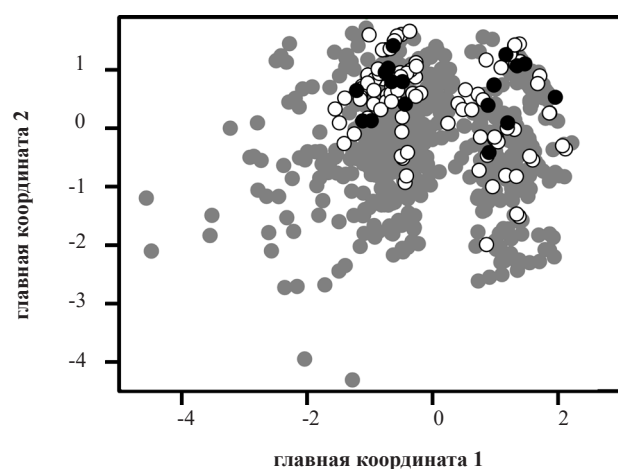
Ассоциативное правило	Поддержка правила
E(-1543)4a(-198) $\triangleright$ E7d(+420)	0,104
E(+347), E13 $\triangleright$ E(-1551)4a(-135)	
E(-1551)4a(-135), E(+347), E13 $\triangleright$ E(-196)17(-5237)	
E(-1551)4a(-157), E17a $\triangleright$ E(-23)11	
E(-1551)4a(-135), E(+347), E13 $\triangleright$ E(+68)8b	

Таблица 2

Примеры транскриптов, структура которых удовлетворяет найденным ассоциативным правилам

Название транскрипта	Структура транскрипта
tr_00026	E(-1551)4a.E5.E6.E(+278)–E8b.E9.E10.E11.E12.E13.E14.E15.E16.E17(-5225)
tr_00156	E(-1551)4a.E5.E6.E(+347)–E8b.E9.E10.E11.E12.E13.E14.E15.E16.E17(-5225)
tr_00218	E(-1551)4a.E5.E6.E(+77)–E8b.E9.E10.E11.E12.E13.E14.E15.E16.E17(-5225)
tr_00279	E(-1551)4a.E5.E6.E(+257)–E8b.E9.E10.E11.E12.E13.E14.E15.E16.E17(-5225)
tr_00341	E(-1551)4a.E5.E6.E(+211)–E8b.E9.E10.E11.E12.E13.E14.E15.E16.E17(-5225)
tr_28360	E(-55)2.E3.E5.E6.E(+278)–E8b.E9.E10.E11.E12.E13.E14.E15a.E15.E16.E17(-5225)
tr_28429	E(-55)2.E3.E5.E6.E(+210)–E8b.E9.E10.E11.E12.E13.E14.E15a.E15.E16.E17(-5225)
tr_28490	E(-55)2.E3.E5.E6.E(+347)–E8b.E9.E10.E11.E12.E13.E14.E15a.E15.E16.E17(-5225)
tr_28551	E(-55)2.E3.E5.E6.E(+77)–E8b.E9.E10.E11.E12.E13.E14.E15a.E15.E16.E17(-5225)
tr_28554	E(-55)2.E3.E5.E6.E(+77)–E8b.E9.E10.E11.E12.E13.E14.E15.E16.E17(-5225)

Примечание. *RUNXI* и *RUNX1T1* экзоны гибридного онкогена разделены знаком « $\leftrightarrow$ » и перечислены в левой и правой частях транскриптов соответственно



**Рис. 2.** Диаграмма распределения исследуемых транскриптов в пространстве первых двух главных координат. Белым цветом указаны экспериментально подтвержденные транскрипты, чёрным цветом отмечены теоретически ожидаемые транскрипты, отобранных на основе ассоциативных правил Apriori, все остальные теоретически ожидаемые транскрипты окрашены серым

правил, структурно расположены очень близко к экспериментальным транскриптам.

Таким образом, используя компьютерное моделирование и методы интеллектуального анализа данных, мы получили компактный список транскриптов онкогена *RUNXI-RUNX1T1*, экспрессия которых в положительных по транслокации t(8;21)(q22;q22) лейкозных клетках вполне возможна, хотя и не доказана пока экспериментально.

Чтобы провести экспериментальную верификацию аналитических результатов, мы получили набор из 46 EST-последовательностей изучаемого онкогена. Примеры структуры таких последовательностей приведены в табл. 3. Из общего списка EST последовательностей мы исключили те варианты, которые содержат новые границы экзонов. Примером такой последовательности может быть EST JZ534352, представленная в табл. 3. Это обусловлено тем, что использован-



ный нами подход моделирования структуры транскриптов не предполагает генерацию новых экзонов, а манипулирует последовательностями уже известных экзонов. Оставшиеся последовательности имеют либо каноническую структуру (например, EST JZ719066), либо такие парные сочетания экзонов (например, EST JZ719069), которых не было обнаружено в структуре полноразмерных РНК онкогена *RUNX1-RUNX1T1*. Последовательностей с канонической структурой оказалось большинство, и их структура согласуется со структурой отобранных для верификации теоретически ожидаемых транскриптов.

Второй подход в экспериментальном поиске предсказанных и отобранных с помощью ассоциативных правил транскриптов был основан на использовании технологии RNA-Seq. В пер-

вую очередь мы воспользовались результатами полнотранскриптомного секвенирования. Нами были опробованы несколько программных инструментов, предназначенных для сборки полноразмерных транскриптов из RNA-Seq прочтений: R/Bioconductor библиотеки *flipflop* и *casper*, геном-зависимый сборщик *Cufflinks* и *de novo* сборщик *Trinity*. Мы также учитывали результаты сравнительных испытаний эффективности сборщиков транскриптома, описанные в литературе [17]. В итоге наш выбор пал на сборщик *Cufflinks*, способный эффективно реконструировать пул альтернативных транскриптов. После фильтрации собранных транскриптов мы получили сиквенсы 13-ти уникальных полноразмерных РНК онкогена *RUNX1-RUNX1T1* (рис. 3).

Таблица 3

Структура некоторых EST-последовательностей онкогена *RUNX1-RUNX1T1*

Название последовательности	Структура последовательности	Код доступа GenBank
RUNX1-RUNX1T1 [П.007]	E5.E6-E8b.E9.E10.E11.E12a	JZ719066
RUNX1-RUNX1T1 [П.024]	E6-E8b.E9.E10.E11.E12.E13.E14.E15.E16.E17(-5237)	JZ534339
RUNX1-RUNX1T1 [П.038]	E(-1814)4a.E5(-19).E(-29)6-E8b	JZ534352
RUNX1-RUNX1T1 [П.049]	E6-E8b.E15a(-119)	JZ719069
RUNX1-RUNX1T1 [П.058]	E5.E6-E8b.E9.E10.E11.E12.E13.E14.E15(+127)	JZ719078

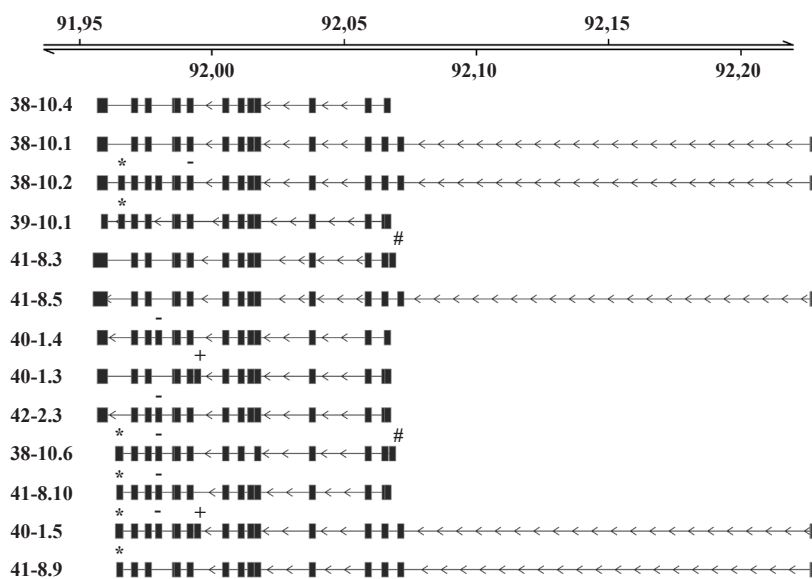
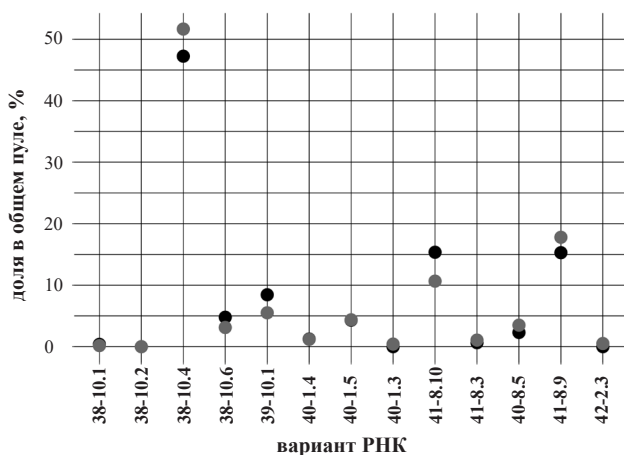


Рис. 3. Структурная организация транскриптов онкогена *RUNX1-RUNX1T1*, собранных из RNA-Seq прочтений, и их локализация в координатах дерева 8-ой хромосомы человека. Направление транскрипции *RUNX1-RUNX1T1* показано стрелками в теле каждого транскрипта. Экзоны представлены полностью закрашенными прямоугольниками. Символом «#» обозначен экзон RUNX1/PR-07, «+» – E12a, «-» – E15a, «\*» – E17a. Геномные координаты (дерево 8-ой хромосомы человека, млн. нуклеотидов) указаны в верхней части диаграммы

Поскольку точность оценки уровней экспрессии отдельных РНК с помощью Cufflinks является неудовлетворительной [18], то была проведена повторная оценка количественного состава собранных РНК с помощью более эффективного инструмента Salmon [19]. Также мы использовали оригинальный код на языке R, чтобы извлечь из каждого транскрипта открытые рамки считывания, вероятность случайного образования которых не превышала 1%, и оценили их кодирующий потенциал.

Мы можем наблюдать, что относительная доля РНК определённого типа не претерпевает существенных изменений между двумя состояниями клеток (рис. 4). Среди полноразмерных транскриптов можно выделить три мажорных варианта РНК, суммарная доля которых в общем пуле составляет порядка 80%. К ним относятся: транскрипт 38-10.4 с относительной долей 47,2% (здесь и далее приводится доля транскрипта в контрольных клетках Kasumi-1), кодирующий полноразмерный гибридный белок; 41-8.9 с относительной долей 15,3%, кодирующий белок с усечённым NHR4 доменом; транскрипт 41-8.10 с относительной долей 15,3%, кодирующий белок с усечёнными доменами NHR3 и NHR4. Относительно высоким уровнем экспрессии обладают транскрипты 39-10.1 (8,4%, кодирует белок, усечённый



**Рис. 4.** Доля альтернативных изоформ РНК онкогена *RUNX1-RUNX1T1* в общем пуле его РНК. Процентная доля каждой РНК была рассчитана как количество транскриптов на миллион/10000. Уровни экспрессии изоформ РНК в контрольных клетках обозначены чёрным цветом, в клетках, обработанных анти-*RUNX1-RUNX1T1* короткими интерферирующими РНК – серым цветом

по NHR3), 38-10.6 (4,8%, кодирует фрагменты областей Runt и NHR3) и 40-1.5 (4,3%, кодирует усечённый по NHR2, 3 и 4 белок, включает 12а экзон), а также 41-8.5 (2,3%, кодирует полноразмерный белок, транскрибируется с внешнего промотора). Транскрипты 38-10.2, 40-1.3 и 40-1.5, несмотря на их успешную сборку с помощью Cufflinks, по результатам анализа с помощью Salmon, не экспрессируются вовсе либо обладают экстремально низкой долей в общем пуле (не более 0,00002%); доля остальных изоформ не превышает 1,5%.

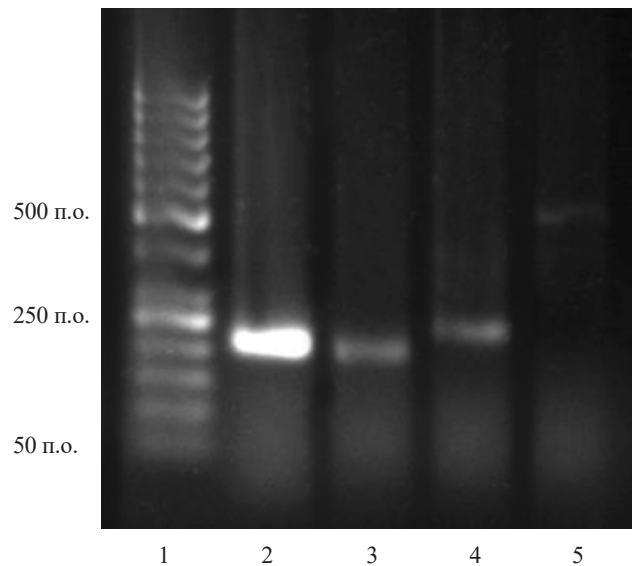
Две из трёх мажорных изоформ транскрибируются с внутреннего промотора, что согласуется с литературными данными, подтверждающими более высокую активность этой области в клетках Kasumi-1 [20]. Большая часть экзонов изучаемого онкогена входит в состав полноразмерных РНК конститутивно, однако наблюдается также включение альтернативно сплайсируемых областей. Помимо экзонов, присутствие которых в транскрипте определяется выбором промоторной области (к ним относятся экзоны E1, E2, E3 и E4a/b), в транскриптах присутствует триада хорошо описанных альтернативных экзонов E12a, E15a и E17a. Эти области содержат внутренние стоп-кодоны, прерывающие трансляцию перед доменами NHR2, NHR3 и NHR4 соответственно.

Кроме того, некоторые сплайсинговые события идентифицированы нами впервые. Во-первых, два альтернативных транскрипта, 38-10.6 и 41-8.3, начинаются с уникального 5'-концевого экзона, отделённого от канонического экзона E4a более чем 720 нуклеотидами. 5'-конец этого экзона относится к области предсказанного промоторного региона *RUNX1/PR-07* [4]. Во-вторых, экзон E17 является 3'-концевым для примерно 60% РНК, транскрибируемых с гибридного локуса (из них кодирующая полноразмерный белок РНК 38-10.4 составляет 47,2%), остальные заканчиваются экзонами E17a. Тем не менее, два полноразмерных транскрипта, 38-10.2 и 39-10.1 (доля последнего составляет 8,4%), включают в свой состав оба этих экзона. Стоит обратить внимание, что, по результатам анализа с помощью KLEAT 2.0, лишь в этих областях у РНК гибридного онкогена осуществляется полиаденилирование. Наконец, в-третьих,

нами были обнаружены транскрипты, в которых наблюдается одновременное присутствие нескольких альтернативных экзонов триады. Примечательно, что один из них, экзон E12a, судя по всему, всегда является внутренним, что не было однозначно установлено прежде. Другие события альтернативного сплайсинга затрагивают экзоны E1, E4a, E9 и E12. Общая характеристика идентифицированных нами альтернативных сплайсинговых событий представлена в табл. 4.

С помощью ПЦР мы подтвердили, что сплайсинг между экзонами E17a и E17, E12a и E12, RUNX1/PR-07 и E4b, детектированный с помощью Cufflinks, действительно осуществляется в клетках Kasumi-1 (рис. 5). Как указывалось выше, доля изоформ РНК, содержащих одновременно экзоны E17a и E17, составляет 8,4% от общего пула; доля транскриптов, включающих сплайсинговые события E12a + E12 и RUNX1/PR-07 + E4b – 4,3% и 5,5%, соответственно. Таким образом, нижняя граница чувствительности нашего метода детекции минорных изоформ РНК достоверно позволяет обнаруживать транскрипты с долей около 4% от общего пула РНК изучаемого онкогена. При этом самой низкой представленностью среди

событий альтернативного сплайсинга обладает усечённая с 5'-конца форма экзона E9 (0,38%).



**Рис. 5.** Верификация событий альтернативного сплайсинга с помощью ПЦР

Дорожки 1 – GeneRuler 50 bp DNA Ladder; 2 – положительный контроль, амплификация фрагмента мРНК гена GUS (203 п.о.); 3 – амплификация соединения экзонов RUNX1/PR07 и E4b (188 п.о.); 4 – амплификация соединения экзонов E12a и E12 (226 п.о.); 5 – амплификация соединения экзонов E17a и E17 (493 п.о.)

**Таблица 4**

Общая характеристика альтернативных сплайсинговых событий, идентифицированных с помощью RNA-Seq в изоформах РНК онкогена *RUNX1-RUNX1T1*

Тип сплайсингового события	Изоформа РНК, включающая событие	Суммарная доля изоформ(-ы) в общем пуле РНК, %
RUNX1/PR-07 + E4b	38-10.6, 41-8.3	5,4
Микроделеция в экзоне E4a	40-1.3 <sup>a</sup> , 40-1.4, 41-8.10 <sup>b</sup> , 42-2.3	16,6
Альтернативный 5'-сайт сплайсинга экзона E9	38-10.1	0,38
Сочетание экзонов E8 + E10	38-10.6	4,8
Сочетание экзонов E11 + E12a + E12	40-1.3 <sup>a</sup> , 40-1.5	4,3
Внутренняя 111-нуклеотидная делеция в экзоне E12	41-8.3	0,65
Сочетание экзонов E15a + E15	38-10.2 <sup>a</sup> , 38-10.6, 40-1.4, 40-1.5, 41-8.10 <sup>b</sup> , 42-2.3 <sup>a</sup>	25,8
Сочетание экзонов E16 + E17a	41-8.9 <sup>b</sup> , 41-8.10 <sup>b</sup>	30,7
Сочетание экзонов E16 + E17	38-10.1, 38-10.4 <sup>b</sup> , 40-1.3 <sup>a</sup> , 41-8.3, 41-8.5, 42-2.3 <sup>a</sup>	53,4
Сочетание экзонов E17a + E17	38-10.2 <sup>a</sup> , 39-10.1	8,4

Примечание. а – транскрипт экспрессируется на экстремально низком уровне либо не экспрессируется; б – мажорный транскрипт с высоким уровнем экспрессии

### Заключение

Сравнение изоформ РНК, идентифицированных по данным RNA-Seq, с теоретически предсказанными транскриптами, прошедшими отбор по ассоциативным правилам, показало, что среди последних преобладают варианты, структурно идентичные мажорным изоформам или схожие с ними по основным блокам экзонов. Особый интерес представляют те теоретически предсказанные транскрипты, которые либо кодируют все функциональные домены, либо содержат блоки экзонов, целиком кодирующих отдельные домены гибридного белка *RUNX1-RUNX1T1*. Например, таковыми являются экзоны E5 и E6, кодирующие ДНК-связывающий домен Runt белка. Причем таких изоформ РНК среди предсказанных и отобранных вариантов преобладающее большинство.

Таким образом, использованный нами комбинированный подход оказался достаточно эффективным в плане предсказания и идентификации новых изоформ РНК онкогена *RUNX1-RUNX1T1* и изучения закономерностей их организации. Полученные результаты указывают на то, что изучаемый онкоген производит несколько мажорных изоформ РНК, а все остальное разнообразие представлено минорными вариантами, структурная схожесть которых с мажорными изоформами может быть ранжирована. Вместе с тем, как EST-последовательности, так и полноразмерные молекулы РНК, собранные из RNA-Seq прочтений, содержат и такие сплайсинговые события, которые не были предсказаны с помощью моделирования. Это указывает на необходимость дальнейшего усовершенствования и усложнения используемой компьютерной модели генерации транскриптов изучаемого онкогена, а также апробирования ее на других, в том числе нормальных, генах человека.

### Список использованных источников

1. Complementing mutations in core binding factor leukemias: from mouse models to clinical applications / A.M.S. Müller [et al.] // *Oncogene*. – 2008. – Vol. 27. – P. 5759–5773.
2. Hatlen, M.A. AML1-ETO driven acute leukemia: insights into pathogenesis and potential therapeutic approaches / M.A. Hatlen, L. Wang, S.D. Nimer // *Front. Med.* – 2012. – Vol. 6. – P. 248–262.
3. Splicing graphs and EST assembly problem / S. Heber [et al.] // *Bioinformatics*. – 2002. – Vol. 18. – P. S181–S188.
4. Decoding of exon splicing patterns in the human *RUNX1-RUNX1T1* fusion gene / V.V. Grinev [et al.] // *Inter. J. Biochem. Cell Biol.* – 2015. – Vol. 68. – P. 48–58.
5. Makhabel, B. Learning data mining with R. – N.-Y.: Packt Publishing, 2014. – 380 p.
6. Bolger, A.M. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data / A.M. Bolger, M. Lohse, B. Usadel // *Bioinformatics*. – 2014. – Vol. 30. – P. 2114–2120.
7. Bonfert, T. Prediction of poly(A) sites by poly(A) read mapping / T. Bonfert, C.C. Friedel // *PLoS One*. – 2017. – Vol. 12. – P. e0170914.
8. Liao, Y. The Subread aligner: fast, accurate and scalable read mapping by seed-and-vote / Y. Liao, G.K. Smyth, W. Shi // *Nucleic Acids Res.* – 2013. – Vol. 41. – P. e108.
9. Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation / C. Trapnell [et al.] // *Nat. Biotechnol.* – 2010. – Vol. 28. – P. 511–515.
10. Integrative Genomics Viewer / J.T. Robinson [et al.] // *Nat. Biotech.* – 2011. – Vol. 29. – P. 24–26.
11. Salmon provides fast and bias-aware quantification of transcript expression / R. Patro [et al.] // *Nat. Meth.* – 2017. – Vol. 14. – P. 417–419.
12. InterPro in 2017 – beyond protein family and domain annotations / R.D. Finn [et al.] // *Nucleic Acids Res.* – 2017. – Vol. 45. – P. D190–D199.
13. Integrating many co-splicing networks to reconstruct splicing regulatory modules / C. Dai [et al.] // *BMC Syst. Biol.* – 2012. – Vol. 6. – P. S17.
14. Exon-domain correlation and its corollaries / M. Liu [et al.] // *Bioinformatics*. – 2005. – Vol. 21. – P. 3213–3216.
15. Левенштейн, В.И. Двоичные коды с исправлением выпадений, вставок и замещений символов / В.И. Левенштейн // Доклады Академии наук СССР. – 1965. – Т. 163.4. – С. 845–848.
16. Лагутин, М.Б. Наглядная математическая статистика : учебное пособие / М.Б. Лагутин. – 3-е изд., испр. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2013. – 472 с.

17. Benchmark analysis of algorithms for determining and quantifying full-length mRNA splice forms from RNA-seq data / K. Hayer [et al.] // *Bioinformatics*. – 2015. – Vol. 31. – P. 3938–3945.

18. Comparative assessment of methods for the computational inference of transcript isoform abundance from RNA-seq data / A. Kanitz [et al.] // *Genome Biology*. – 2015. – Vol. 16. – P. 150.

19. Salmon provides fast and bias-aware quantification of transcript expression / R. Patro [et al.] // *Nat. Meth.* – 2017. – Vol. 4. – P. 417–419.

20. Markova, E. Transcription of the AML1/ETO chimera is guided by the P2 promoter of the AML1 gene in the Kasumi-1 cell line / E. Markova, S. Kantidze, S. Razin // *Gene*. – 2012. – Vol. 510. – P. 142–146.

I.M. Ilyushonak<sup>1</sup>, E.P. Gunko<sup>1</sup>, M.L. Antonovich<sup>1</sup>, M.M. Yatskou<sup>1</sup>, A.M. Kustanovich<sup>2</sup>,  
A.Y. Sukhareuski<sup>3</sup>, V.V. Skakun<sup>1</sup>, V.V. Grinev<sup>1</sup>

## STUDY OF RNA SPLICING PATTERNS OF THE HUMAN *RUNX1-RUNX1T1* FUSION ONCOGENE BY THE METHODS OF DATA MINING AND HIGH-THROUGHPUT DNA SEQUENCING

<sup>1</sup>Belarusian State University

Minsk BY-220030, the Republic of Belarus

<sup>2</sup>Belarussian research center for pediatric oncology, hematology and immunology

Minsk region BY-223053, the Republic of Belarus

<sup>3</sup>Institute of Cell Biology, Edinburgh University

Darwin Building, The King's Buildings EH9 3BF, Edinburgh, UK

The fusion oncogene *RUNX1-RUNX1T1* is one of the factors of initiation and formation of acute myeloid leukemia in children and adults. This oncogene encodes more than 130 RNA isoforms, the patterns of formation of which are not fully established. In this Article, associative rules for combining the exons of the studied oncogene were found, the structure of new but unknown transcripts was modeled, and experimental validation of predicted transcripts was performed using conventional as well as high-performance molecular genetic methods.

**Key words:** fusion oncogene *RUNX1-RUNX1T1*, RNA splicing, data mining, next-generation sequencing.

Дата поступления статьи: 31 августа 2017 г.

Ю.А. Могулевцева<sup>1</sup>, А.В. Мезенцев<sup>2</sup>, С.А. Брускин<sup>2</sup>

## АНАЛИЗ ИЗМЕНЕНИЙ, ВЫЗВАННЫХ РНК-ИНТЕРФЕРЕНЦИЕЙ ММП1, В ЭПИДЕРМАЛЬНЫХ КЕРАТИНОЦИТАХ, ОБРАБОТАННЫХ ИНТЕРФЕРОНОМ- $\gamma$

<sup>1</sup>Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Российский государственный аграрный университет» (МСХА им. К.А. Тимирязева)  
Россия, 127550, г. Москва, ул. Тимирязевская, 49

<sup>2</sup>Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова» (ИОГен РАН); e-mail: mesentsev@vigg.ru  
Россия, 119333, г. Москва, ул. Губкина, 3

В работе показано, что при превышении физиологической концентрации IFN- $\gamma$  в эпидермальных кератиноцитах с «нокдауном» *MMP1* снижается экспрессия *CCNA2* и *CCND1*, увеличивается экспрессия *IVL*, *FLG*, *KRT1*, *-5* и *-10*, уменьшаются скорость пролиферации клеток и их мобильность. Таким образом, «нокдаун» *MMP1* может иметь клиническое значение при лечении псориаза, благодаря увеличению экспрессии генов, контролирующих дифференцировку данного типа клеток и наблюдаемому антипролиферативному эффекту.

**Ключевые слова:** матриксная металлопротеиназа 1, малая интерферирующая РНК, цитокератины, циклины, псориаз.

### Введение

Будучи одним из наиболее массовых дерматозов, псориаз, в то же время, остается неизлечимым заболеванием [1]. Используемые для лечения псориаза лекарственные препараты позволяют, в большинстве случаев, контролировать болезнь только в течение определенного периода времени, поскольку они не направлены на устранение ее причин. В связи с этим, четкое представление о той роли, которую играют в патогенезе псориаза отдельные его участники, такие как матриксные металлопротеиназы и провоспалительные  $T_{H1}$  цитокины, могло бы быть использовано в разработке новых терапевтических подходов и применено для лечения этой болезни.

Нашей целью было исследовать последствия РНК-интерференции матриксной металлопротеиназы 1 (ММП1) в эпидермальных кератиноцитах человека, обработанных интерфероном  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), который при псориазе, наряду с другими цитокинами, участвует в индукции иммунного ответа. В проведенном исследовании было показано, что РНК-интерференция ММП1 в условиях превышения физиологической концентрации IFN- $\gamma$  подавляет пролиферацию культивируемых эпидермальных кера-

тиноцитов и способствует экспрессии в этих клетках маркеров их дифференцировки. Очевидно, что особенности клинической картины при псориазе, такие, как гиперпролиферация эпидермальных кератиноцитов и нарушения в процессе их дифференцировки [2], позволяют использовать РНК-интерференцию ММП1 для воздействия на патогенез этой болезни.

### Материалы и методы

#### Культивирование клеток

Для проведения экспериментальной работы использовали культуры эпидермальных кератиноцитов человека, HaCaT-КТР и HaCaT-ММП1, полученные методом лентивирусной трансдукции, как описано ранее [3]. Упомянутые линии клеток экспрессировали либо малую ингибирующую РНК (миРНК), специфичную к ММП1 (HaCaT-ММП1), либо контрольную миРНК (HaCaT-КТР) того же нуклеотидного состава. В отличие от исходной линии клеток (HaCaT), HaCaT-ММП1 и HaCaT-КТР также экспрессировали два дополнительных гена, которые были закодированы в геноме использованных для их получения рекомбинантных лентивирусов: фактор устойчивости к пурамицину (*PuroR*) и зеленый

флюоресцентный белок (*copGFP*). Благодаря экспрессии *PuroR*, культивируемые клетки НаСаТ-ММП1 и НаСаТ-КТР обладали устойчивостью к пурамицину, а благодаря экспрессии *copGFP* испускали флюоресцентный свет.

Клетки культивировали в среде ДМЕМ, которая содержала *L*-глутамин (ПанЭко, Россия), антибиотик-антимикотик и 2,5% эмбриональной сыворотки теленка (Thermo Fisher Scientific, США). Культуральную среду меняли через день. При покрытии клетками 70–75% ростовой поверхности культуру пересевали в соотношении 1:5. Для подсчета клеток использовали камеру Горяева. Для определения доли флюоресцирующих кератиноцитов в культуре использовали сервисную опцию Cell counter компьютерной программы ImageJ (НИН, США).

#### *Получение суммарной РНК*

Для выделения суммарной РНК из клеток использовали TRIZOL (Thermo Fisher Scientific, США), как описано ранее [4]. Качество препаратов РНК проверяли методом электрофореза в 1,5%-ном агарозном геле в денатурирующих условиях [5]. Для измерения концентрации РНК использовали флюориметрический метод и набор реагентов Qubit RNA BR Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, США) в соответствии с указаниями фирмы-производителя.

#### *ПЦР в режиме реального времени*

Перед проведением эксперимента из образцов выделенной РНК получали кДНК, используя набор реагентов MMLV RT (Евроген, Россия). При проведении ПЦР в режиме реального времени использовали праймеры выбранных генов из базы данных Probe [6]. Эксперименты проводили на приборе Eco (Illumina, США). В качестве эндогенного контроля использовали данные об экспрессии гена *ACTB*. Результаты анализировали при помощи компьютерной программы Eco, предоставленной производителем прибора. Для каждого измерения готовили три параллельные пробы. Каждый эксперимент повторяли трижды.

#### *Количественная оценка пролиферации клеток*

Для количественной оценки пролиферации в 6-луночные планшеты высевали по 40 000 клеток на лунку. Ежедневно случайно выбранные образцы обрабатывали 0,25%-ным раствором трипсина–ЭДТА (ПанЭко, Россия), после чего, используя камеру Горяева, в них опреде-

ляли количество клеток. Данные о количестве клеток в образцах использовали для построения кривых роста. Результаты представляли в линейных координатах. Каждый эксперимент повторяли трижды.

#### *Количественная оценка миграции клеток*

Для количественной оценки миграции клетки культивировали до тех пор, пока они полностью не покрывали ростовую поверхность. Перед началом эксперимента, используя носик для автоматической пипетки на 1 мл, по поверхности чашки проводили прямую линию, очищая от клеток полосу шириной ~1,25 мм. Полученные таким образом образцы обрабатывали IFN- $\gamma$  (50 нг/мл) и культивировали в течение 5–6 дней, ежедневно фотографируя репрезентативные участки пока незанятых клетками областей. Для количественной оценки свободной от клеток ростовой поверхности использовали сервисную опцию «Freehand selection» компьютерной программы ImageJ.

#### *Статистическая обработка результатов*

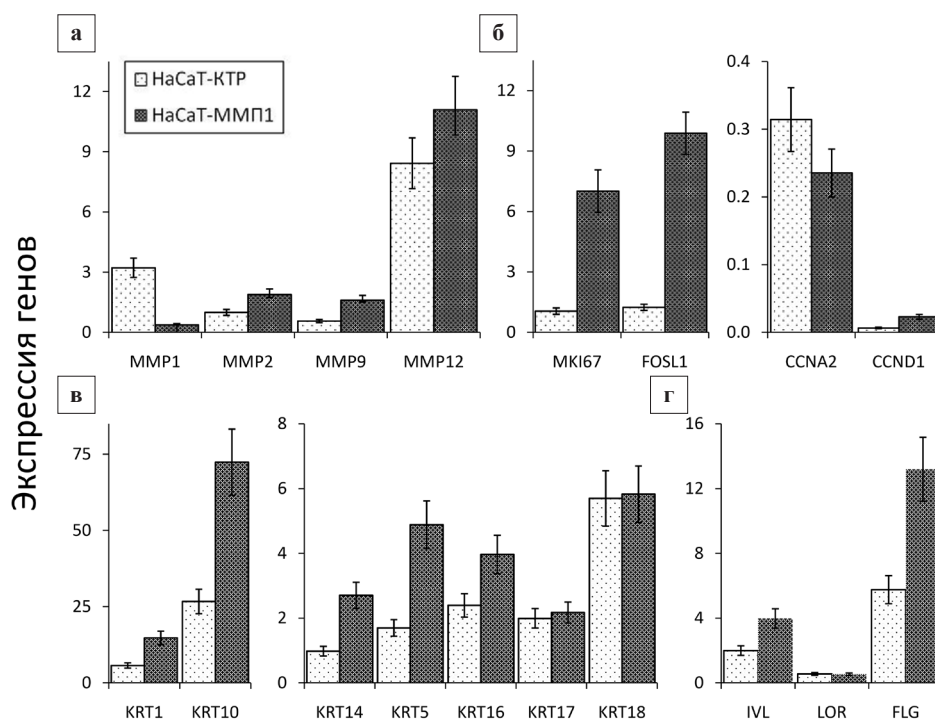
Результаты измерений представляли в виде «среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение». Для сравнения средних значений двух и более групп использовали однофакторный дисперсионный анализ. Если вероятность ошибки при отклонении нулевой гипотезы не превышала 0,05, то статистические различия между средними величинами считали статистически значимыми.

## **Результаты и обсуждение**

Изменения в экспрессии генов. Обработка клеток НаСаТ-КТР и НаСаТ-ММП1 провоспалительным цитокином IFN- $\gamma$  сопровождается изменениями в экспрессии генов матриксных металлопротеиназ (рис. 1а), маркеров дифференцировки эпидермальных кератиноцитов (рис. 1б) и пролиферации (рис. 1в), а также цитокератинов (рис. 1г).

Данные измерений нормировали по уровню экспрессии гена *ACTB*. Изменения генной экспрессии в НаСаТ-ММП1 и НаСаТ-КТР, обработанных IFN- $\gamma$  (50 нг/мл) приведены относительно контроля (клеток НаСаТ-КТР, не обработанных IFN- $\gamma$ )

Так, среди матриксных металлопротеиназ наиболее существенные изменения, по сравнению с необработанными IFN- $\gamma$  клетками НаСаТ-КТР, происходили в экспрессии *MMP12*



**Рис. 1.** Изменения генной экспрессии в эпидермальных кератиноцитах человека HaCaT-MMPI1 и HaCaT-KTP, обработанных IFN- $\gamma$ : а – изменения матричных металлопротеиназ; б – маркеров пролиферации; в – цитокератинов; г – маркеров дифференцировки

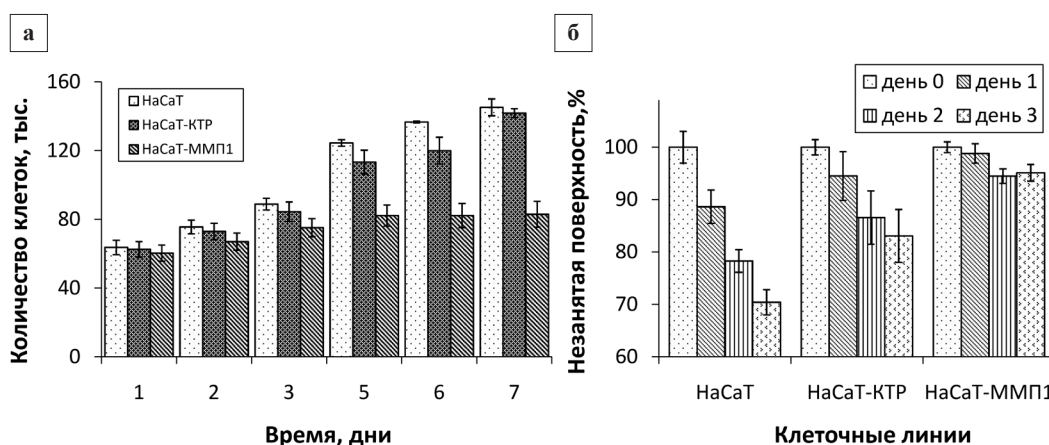
( $8,434 \pm 1,265$  – в HaCaT-KTP и  $11,097 \pm 1,665$  – в HaCaT-MMPI1,  $p = 0,024$ ). При этом уровень экспрессии *MMP1* в HaCaT-MMPI1 ( $0,017 \pm 0,003$ ) сохранялся на низком уровне, несмотря на присутствие в культуральной среде IFN- $\gamma$ , а экспрессия *MMP2* и *-9* в обеих линиях клеток, обработанных цитокином, не превышала существенно уровни экспрессии этих генов в контрольных образцах (рис. 1а).

Обработка клеток HaCaT-KTP и HaCaT-MMPI1 также приводит к существенному подавлению экспрессии циклинов A2 и D1 (рис. 1б). Так экспрессия *CCNA2* в HaCaT-KTP и HaCaT-MMPI1 составила  $0,314 \pm 0,047$  и  $0,235 \pm 0,035$  ( $p = 0,04995$ ), а экспрессия *CCND1* –  $0,007 \pm 0,001$  и  $0,023 \pm 0,003$ , соответственно, ( $p = 0,009$ ). Мы также наблюдали существенные различия между HaCaT-KTP и HaCaT-MMPI1 в экспрессии маркера пролиферации *MKI67* ( $1,056 \pm 0,158$  и  $7,011 \pm 1,052$ ,  $p = 0,016$ , соответственно), транскрипционного фактора *FOSL1* ( $1,244 \pm 0,187$  и  $9,890 \pm 1,484$ ,  $p = 0,016$ ), генов цитокератинов, которые характерны для стратифицированных эпителиальных тканей – *KRT1*, *-5* и *-10*, (рис. 1в), а также маркеров дифференци-

ровки эпидермальных кератиноцитов – *IVL* и *FLG* (рис. 1г). Экспрессия *KRT1* составила  $5,742 \pm 0,861$  – в HaCaT-KTP и  $14,777 \pm 2,217$  – в HaCaT-MMPI1 ( $p = 0,022$ ). Экспрессия *KRT5* составила  $1,700 \pm 0,255$  – в HaCaT-KTP и  $4,888 \pm 0,783$  – в HaCaT-MMPI1 ( $p = 0,017$ ). Экспрессия *KRT10* составила  $26,738 \pm 4,011$  – в HaCaT-KTP и  $72,405 \pm 10,861$  – в HaCaT-MMPI1 ( $p = 0,017$ ). Экспрессия *IVL* составила  $1,999 \pm 0,300$  – в HaCaT-KTP и  $3,982 \pm 0,597$  – в HaCaT-MMPI1 ( $p = 0,015$ ). Экспрессия *FLG* составила  $5,765 \pm 0,865$  – в HaCaT-KTP и  $13,191 \pm 1,979$  – в HaCaT-MMPI1 ( $p = 0,017$ ).

Оценка изменений в скорости пролиферации и миграции. Сравнительный анализ кривых роста клеток HaCaT-KTP и HaCaT-MMPI1 показал, что в условиях повышенной концентрации IFN- $\gamma$ , РНК-интерференция MMP1 приводит к существенному снижению пролиферации клеток (рис. 2а). При этом для контрольной линии клеток был характерен устойчивый рост в течение всего времени проведения эксперимента. Напротив, в количестве клеток с РНК-интерференцией MMP1 в последние три дня эксперимента достоверных отличий выявлено не было ( $p = 0,5$ ).

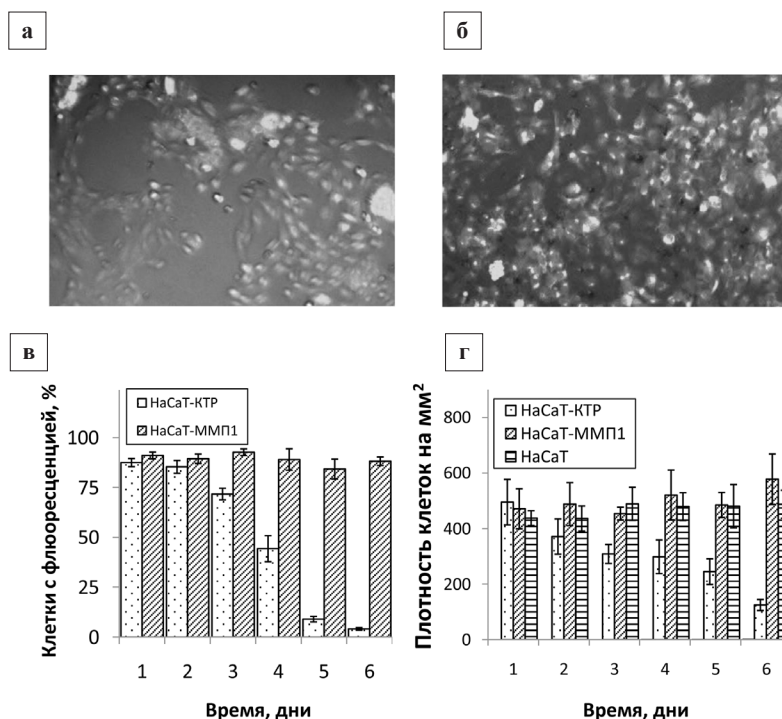




**Рис. 2.** Оценка скорости пролиферации и миграции трансдуцированных клеток в присутствии IFN- $\gamma$ : а – анализ кривых роста; б – количественная оценка скорости миграции клеток HaCaT-MMP1 и HaCaT-KTR. Концентрация IFN- $\gamma$  – 50 нг/мл

Сопоставление скоростей миграции клеток показало, что IFN- $\gamma$  фактически блокирует перемещение HaCaT-MMP1 (рис. 2б). При этом HaCaT-KTR в течение первых трех дней культивирования покрывали около ~17% свободной поверхности, а нетрансдуцированные клетки – ~30%. Примечательно также, что

более длительное культивирование HaCaT-KTR сопровождается образованием полостей в удаленных от границы монослоя областях (рис. 3а, 3б), а также снижением плотности клеток (рис. 3г). Клетки HaCaT-KTR утрачивают характерную для кератиноцитов полигональную форму и открепляются от ростовой



**Рис. 3.** Морфологические и биометрические параметры трансдуцированных клеток, обработанных IFN- $\gamma$ . а – морфологические особенности клеток HaCaT-KTR; б – HaCaT-MMP1, культивируемых в присутствии IFN- $\gamma$ . Время культивирования – 3 дня. Символом «П» обозначены образующиеся между клетками пустоты; в, г – изменения доли клеток с флуоресценцией и плотности клеток в культуре, соответственно. Концентрация IFN- $\gamma$  – 50 нг/мл

поверхности. Доля клеток с флюоресценцией снижается более чем в 10 раз (рис. 3в), что косвенно свидетельствует о нарушении в этих клетках нормального хода процессов транскрипции и прекращении ими экспрессии трансгенов (*copGFP*, *PuroR* и контрольной миРНК). Напротив, аналогичные изменения в HaCaT-MMP1 были незначительны (рис. 3б–г). Помимо этого, в препаратах РНК, полученных из HaCaT-КТР, возрастает экспрессия генов *DAPK1* и *IRF8*, связанных с апоптозом (рис. 4), по сравнению с HaCaT-MMP1.

В данной работе нами были исследованы возможные последствия РНК-интерференции MMP1 в эпидермальных кератиноцитах человека, обработанных IFN- $\gamma$ . Нами были охарактеризованы морфологические изменения, которые происходят в культурах клеток с разным уровнем экспрессии MMP1 (рис. 3) и установлены различия в скоростях их миграции и пролиферации (рис. 2). Наконец, нами было показано, что присутствие в культуральной среде IFN- $\gamma$  по-разному сказывается на экспрессии специфических генов-маркеров в эпидермальных кератиноцитах с «нокдауном» MMP1 и без него (рис. 1). Так, добавление IFN- $\gamma$  в культуру клеток HaCaT-MMP1 стимулирует их дифференцировку и подавляет пролиферацию, тогда как конфлюэнтная культура HaCaT-КТР обнаруживает признаки апоптоза: гибель культивируемых клеток (рис. 3), а

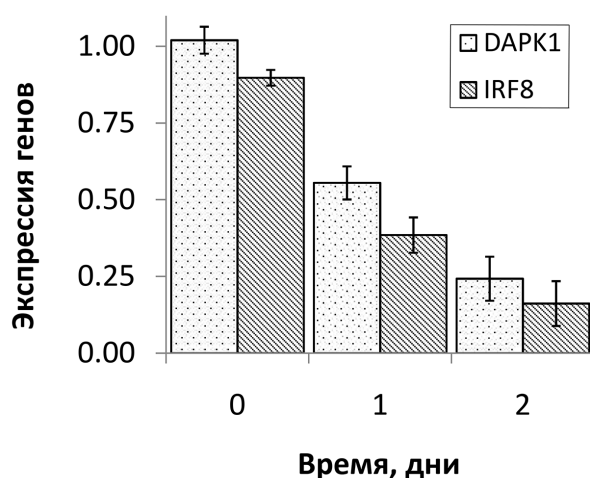


Рис. 4. Относительный уровень экспрессии генов *DAPK1* и *IRF8* в стационарных культурах клеток HaCaT-MMP1 в присутствии IFN- $\gamma$  относительно HaCaT-КТР. Концентрация IFN- $\gamma$  в культуральной среде составляла 50 нг/мл

также повышенный уровень экспрессии вовлеченных в апоптоз генов (*DAPK1* и *IRF8*), контролируемых IFN- $\gamma$  (рис. 4).

Провоспалительный цитокин интерферон  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), который мы использовали в нашем исследовании, наряду с фактором некроза опухоли (TNF) и интерлейкином 17 (IL-17) является одним из ключевых индукторов иммунного ответа при псориазе. Так, IFN- $\gamma$  индуцирует экспрессию молекул гистосовместимости (*MHC1* и *MHC2*) и компонентов иммунопротеосомы [7], которые необходимы для презентации чужеродных антигенов клеткам иммунной системы и для процессинга, т.е. частичного переваривания, чужеродных антигенов и их подготовку к презентации, соответственно. Помимо этого, IFN- $\gamma$  стимулирует дифференциацию клеток-хелперов  $T_{H1}$ , которые при псориазе являются основным участником воспалительного процесса [8]. Известно также, что подкожные инъекции IFN- $\gamma$ , сделанные больным псориазом, часто вызывают зуд, появление сыпи и образование псориазических бляшек по месту инъекции [9].

При работе с культурами эпидермальных кератиноцитов мы использовали IFN- $\gamma$  в концентрации 50 нг/мл (400 МЕ/мл) [10]. Это значение значительно превышает как концентрацию IFN- $\gamma$  в сыворотке крови здоровых людей ( $8,0 \pm 1,5$  пг/мл), так и больных псориазом ( $33,8 \pm 1,3$  пг/мл [11]). С другой стороны, согласно литературным данным, в исследованиях физиологических эффектов IFN- $\gamma$  (влияние этого цитокина на миграцию [12, 13], пролиферацию [14, 15], апоптоз [16], а также секрецию биологически активных веществ [17]) часто используют более высокие концентрации IFN- $\gamma$  (5–100 нг/мл). По-видимому, это необходимо в силу того, что главные продуценты IFN- $\gamma$ , активированные клетки-киллеры (NK), цитотоксические T-клетки (CTL), макрофаги, которые сосредоточены непосредственно в очаге воспаления [18]. Соответственно, концентрация IFN- $\gamma$  в воспаленной ткани должна существенно превышать его концентрацию в кровотоке. Таким образом, мы выбрали концентрацию IFN- $\gamma$  50 нг/мл, которая, согласно данным цитируемых работ, необходима для того, чтобы воспроизвести физиологические эффекты, характерные для воспаленной ткани.

Анализ изменений в экспрессии генов позволил выявить следующие закономерности. Прежде всего, РНК-интерференция ММП1 (рис. 1а) привела к существенному снижению экспрессии целевого гена. В то время, как в клетках HaCaT-KTP, обработанных IFN- $\gamma$ , экспрессия *MMP1* возрастала в 3,2 раза, по сравнению с HaCaT-KTP, не обработанными этим цитокином, значение аналогичного параметра в HaCaT-MMP1 составляло 0,38. Последнее свидетельствует о том, что специфичные миРНК могут быть использованы для того, чтобы контролировать экспрессию *MMP1* в пораженном болезнью участке ткани.

Кроме того, для трех групп генов (маркеров дифференцировки эпидермальных кератиноцитов, эпидермальных цитокератинов и циклинов) мы наблюдали схожие изменения в обеих линиях клеток. Так, нами было показано, что экспрессия маркеров дифференцировки (*IVL* и *FLG*), а также эпидермальных цитокератинов (*KRT1*, -5, -10) увеличивается (рис. 1в и г), а экспрессия циклинов (*CCNA2* и *CCND1*) — снижается (рис. 1б). На основании первого можно предположить, что инкубация HaCaT-KTP и в большей степени HaCaT-MMP1 с IFN- $\gamma$  способствует дифференцировке эпидермальных кератиноцитов. На основании второго можно прийти к заключению, что IFN- $\gamma$  в условиях проведенного эксперимента может обладать антипролиферативным эффектом. Оба утверждения подтверждаются экспериментально. Так, инкубация обоих типов клеток с IFN- $\gamma$  как существенно снижает их скорость пролиферации (рис. 2а), так и уменьшает подвижность (рис. 2б).

С другой стороны, обращает на себя внимание, что в HaCaT-MMP1 существенно превышен уровень экспрессии маркера клеточной пролиферации *MKI67*, и эпидермального цитокератина *KRT14*. Согласно литературным данным [19], экспрессия гена *MKI67* происходит практически во всех фазах клеточного цикла, за исключением интерфазы. Соответственно, уровень экспрессии *MKI67* в культуре, тем больше, чем больше клеток переходит к делению. При этом, чем меньше уровень экспрессии *CCNA2*, белковый продукт которого необходим для перехода клеток из  $G_2$  фазы

клеточного цикла непосредственно к митозу ( $M$ ), тем больше клеток остаются в  $G_1$ , претерпевая « $G_1$  арест». Последнее приводит к прерыванию клеточного цикла и гибели клетки. Согласно же полученным нами данным, присутствие в культуральной среде IFN- $\gamma$  приводит к существенному снижению скорости пролиферации в HaCaT-MMP1, по сравнению с клетками HaCaT-KTP, обработанными IFN- $\gamma$  (рис. 2).

Примечательно, что аналогичные изменения происходят в экспрессии гена *FOSL1*. (рис. 1б). В литературе индукцию *FOSL1* часто связывают с увеличением пролиферации и миграции раковых клеток [20], а также с происходящими в этих клетках морфологическими изменениями [21]. Согласно же полученным нами данным, клетки с повышенным уровнем экспрессии *FOSL1* (HaCaT-MMP1) мигрируют (рис. 2б) и делятся (рис. 2а) медленнее, чем контрольная линия клеток. По-видимому, это может быть следствием того, что, в нераковых клетках, таких как HaCaT [22], не активирован механизм стабилизации *FOSL1* на посттрансляционном уровне [23]. Вследствие этого *FOSL1* деградирует в цитоплазме, не оказывая существенного влияния на транскрипцию подконтрольных ему генов и регулируемые ими физиологические процессы.

В то же время, РНК-интерференция ММП1 приводит к более чем двукратному увеличению экспрессии *KRT14*, которое сопоставимо с изменениями в экспрессии *KRT14* в пораженной псориазом коже [24]. В связи с этим, является примечательным, что увеличение экспрессии *KRT14* в HaCaT-MMP1 происходит на фоне увеличения экспрессии маркеров дифференцировки (*IVL* и *FLG*), а также существенного снижения скорости пролиферации клеток. С нашей точки зрения, наблюдаемый феномен объясняется тем, что, в отличие от дифференцировки первичных клеток, дифференцировка иммортализованных кератиноцитов HaCaT носит обратимый характер [25]. Снижение уровня экспрессии *MMP1*, в свою очередь, смещает баланс между дифференцировкой клеток и их пролиферацией в сторону дифференцировки (рис. 3). При этом наблюдаемые изменения в HaCaT-MMP1 происходят настолько быстро, что предотвращают развитие апоптоза (рис. 3, 4).

### Заключение

Полученные нами данные представляют практический интерес и могут быть использованы для разработки лекарственных препаратов, принцип действия которых аналогичен тому, который описан в данном исследовании. Согласно представленным в работе результатам, РНК-интерференцию ММП1 можно использовать для ослабления провоспалительного эффекта IFN- $\gamma$  при псориазе: во-первых, для того, чтобы стимулировать экспрессию генов *IVL* и *FLG*, а также эпидермальных цитокератинов 1, -5, -10 и -14, которая понижена в пораженной псориазом коже, а, во-вторых, снизить скорость пролиферации данного типа клеток. Последнее представляется немаловажным, в особенности, если принять во внимание, что гиперпролиферация эпидермальных кератиноцитов является одним из ключевых элементов патогенеза псориаза, а многие из лекарств, используемые для лечения этой болезни, обладают цитостатическим эффектом.

### Список использованных источников

1. Изучение молекулярных механизмов патогенеза иммуноопосредованных воспалительных заболеваний на примере псориаза / Э.С. Пирузян [и др.] // *Acta Naturae*. – 2009. – Т. 1. № 3. – С. 139–150.
2. Болотная, Л.А. Псориаз: патогенез, клинические проявления, принципы терапии / Л.А. Болотная // *Східноєвропейський журнал внутрішньої та сімейної медицини*. – 2015. – № 1. – С. 4–9.
3. Могулевцева, Ю.А. Оптимизация условий лентивирусной трансдукции иммортализованных эпидермальных кератиноцитов / Ю.А. Могулевцева, А.В. Мезенцев // *Развитие современной науки: теоретические и прикладные аспекты*. – 2017. – № 13. – С. 123–134.
4. Chomczynski, P. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction / P. Chomczynski, N. Sacchi // *Anal. Biochem.* – 1987. – Vol. 162. № 1. – P. 156–159.
5. Aranda, P.S. Bleach gel: a simple agarose gel for analyzing RNA quality / P.S. Aranda, D.M. LaJoie, C.L. Jorcyk // *Electrophoresis*. – 2012. – Vol. 33. – № 2. P. 366–369.
6. Probe [Electronic resource] / U.S. National Library of Medicine. – 2017. – Mode of access: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/probe/>. – Date of access: 14.07.2017.
7. Major histocompatibility complex (MHC2+) perivascular macrophages in the axotomized facial motor nucleus are regulated by receptors for interferon-gamma (IFN $\gamma$ ) and tumor necrosis factor (TNF) / Z.Q. Liu [et al.] // *Neuroscience*. – 2005. – Vol. 131. № 2. – P. 283–292.
8. The Th1 life cycle: molecular control of IFN- $\gamma$  to IL-10 switching / A. Cope [et al.] // *Trends Immunol.* – 2011. – Vol. 32. № 6. – P. 278–286.
9. Cellular localization of interleukin-8 and its inducer, tumor necrosis factor-alpha in psoriasis / B.J. Nickoloff [et al.] // *Am. J. Pathol.* – 1991. – Vol. 138. № 1. – P. 129–140.
10. Конвертер международных единиц [Электронный ресурс] / PharmCommunity, Сообщество профессионалов фарминдустрии. – 2017. – Режим доступа: <https://www.rndsistemas.com/resources/technical-information/unit-conversion-table>. – Дата доступа: 14.07.2017.
11. Simultaneous measurement of multiple Th1 and Th2 serum cytokines in psoriasis and correlation with disease severity / S.E. Jacob [et al.] // *Mediators Inflamm.* – 2003. – Vol. 12. № 5. – P. 309–313.
12. IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  differentially regulate immunomodulation by murine mesenchymal stem cells / K. English [et al.] // *Immunol Lett.* – 2007. – Vol. 110. № 2. – P. 91–100.
13. Immunotherapy with CpG oligonucleotides and antibodies to TNF- $\alpha$  rescues neonatal mice from lethal arenavirus-induced meningoencephalitis / J.A. Pedras-Vasconcelos [et al.] // *J. Immunol.* – 2008. – Vol. 180. № 12. – P. 8231–8240.
14. Phosphorus fractionation in different trophic sediments of lakes from different regions, China / S. Huo [et al.] // *Environ. Monit.* – 2011. – Vol. 13. № 4. – P. 1088–1095.
15. García-Sánchez O. Interferon- $\gamma$  Reduces the Proliferation of Primed Human Renal Tubular Cells / O. García-Sánchez, J.M. López-Novoa, F.J. López-Hernández // *Nephron Extra.* – 2014. – Vol. 4. № 1. – P. 1–7.
16. Evaluation of IFN- $\gamma$  effects on apoptosis and gene expression in neuroblastoma –preclinical studies / T.M. Tekautz [et al.] // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2006. – Vol. 1763. № 10. – P. 1000–1010.

17. Effect of Cell Seeding Density and Inflammatory Cytokines on Adipose Tissue-Derived Stem Cells: an in Vitro Study / P. Sukho [et al.] // *Stem. Cell. Rev.* – 2017. – Vol. 13. № 2. – P. 267–277.
18. Schoenborn, J.R. Regulation of interferon-gamma during innate and adaptive immune responses / J.R. Schoenborn, C.B. Wilson // *Adv. Immunol.* – 2007. – Vol. 96. – P. 41–101.
19. Bruno, S. Cell cycle dependent expression and stability of the nuclear protein detected by Ki-67 antibody in HL-60 cells / S. Bruno, Z. Darzynkiewicz // *Cell. Prolif.* – 1992. – Vol. 25. № 1. – P. 31–40.
20. Transcriptional basis of KRAS oncogene-mediated cellular transformation in ovarian epithelial cells / O.I. Tchernitsa [et al.] // *Oncogene.* – 2004. – Vol. 23. № 26. – P. 4536–4555.
21. Fra-1/AP-1 induces EMT in mammary epithelial cells by modulating Zeb1/2 and TGF $\beta$  expression / L. Bakiri [et al.] // *Cell death and differentiation.* – 2015. – Vol. 22. № 22. – P. 336–350.
22. Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line / P. Boukamp [et al.] // *J. Cell. Biol.* – 1988. – Vol. 106. № 3. – P. 761–771.
23. c-Ha-ras oncogene expression in immortalized human keratinocytes (HaCaT) alters growth potential in vivo but lacks correlation with malignancy / P. Boukamp [et al.] // *Cancer Res.* – 1990. – Vol. 50. № 9. – P. 2840–2847.
24. Proteogenomic analysis of psoriasis reveals discordant and concordant changes in mRNA and protein abundance / W.R. Swindell [et al.] // *Genome Med.* – 2015. – Vol. 7. № 1. – e86.
25. Deyrieux, A.F. In vitro culture conditions to study keratinocyte differentiation using the HaCaT cell line / A.F. Deyrieux, V.G. Wilson // *Cytotechnology.* – 2007. – Vol. 54. № 2. – P. 77–83.

J.A. Mogulevtseva<sup>1</sup>, A.V. Mezentsev<sup>2</sup>, S.A. Bruskin<sup>2</sup>

## CHANGES CAUSED BY MMP1-SILENCING IN EPIDERMAL KERATINOCYTES PRETREATED WITH INTERFERON- $\gamma$ AND THEIR ANALYSIS

This paper reports that an exposure of epidermal keratinocytes with silenced MMP1 to IFN- $\gamma$  causes a decline of *CCNA2* and *CCND1* and an increase of *IVL*, *FLG*, *KRT1 -5* and *-10* expression. Moreover, it slows down cell proliferation and impairs cell mobility. In this respect, knocking MMP1 down can be beneficial for psoriasis due to the observed antiproliferative effect and the ability to promote cell differentiation.

**Key words:** matrix metalloproteinase 1, small hairpin RNA, cytokeratins, cyclins, psoriasis

*Дата поступления статьи: 17 июля 2017 г.*

Научное издание

## **МОЛЕКУЛЯРНАЯ И ПРИКЛАДНАЯ ГЕНЕТИКА**

СБОРНИК НАУЧНЫХ ТРУДОВ

Том 23

Ответственный за выпуск *И.В. Широкая*  
Верстка *Е.А. Бельская*  
Корректор *И.В. Широкая*  
Технический редактор *Е.А. Бельская*  
Переводчик *М.Г. Пыжова*

Подписано в печать 01.11.2017. Формат 60×84 <sup>1</sup>/<sub>8</sub>. Бумага офсетная. Гарнитура Times.  
Печать цифровая. Усл. печ. л. 12,79. Уч. изд. л. 7,52. Тираж 100 экз. Заказ №  
Отпечатано в типографии ЧУП «Альтиора».

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