

П. В. Кузмицкая, Е. С. Королева, О. Ю. Урбанович

Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

ВЛИЯНИЕ ДЕФИЦИТА ВЛАГИ НА ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ, КОДИРУЮЩИХ СТРЕСС-АССОЦИИРОВАННЫЕ БЕЛКИ ЯБЛОНИ

Аннотация. У растений стресс-ассоциированные белки (SAP, stress-associated proteins) участвуют в ответе на воздействие неблагоприятных биотических и абиотических факторов. С целью изучения влияния засухи на изменение уровня экспрессии SAP у яблони и их вовлеченности в стрессовый ответ проведен анализ уровней экспрессии 14 генов, отнесенных к этому семейству, с помощью количественной ПЦР (qPCR). Показано их участие в геноме подвоя яблони сорта ММ-106 при стрессовом ответе на засуху.

При этом к 4-му часу воздействия засухи наблюдалась тенденция к повышению экспрессии данных генов, а к 24-му часу отмечалось ее снижение. Сравнение этих данных с результатами, полученными при моделировании засухи в более мягких условиях, показало, что при моделировании засухи в более жестких условиях экспрессия у большего количества генов, кодирующих стресс-ассоциированные белки, повышается и имеет место более выраженный ответ. Оценка влияния степени идентичности нуклеотидных последовательностей этих генов на сходство их профилей экспрессии при воздействии засухи не выявила непосредственной зависимости между первичной структурой генов и характером их экспрессии.

В структуре стресс-ассоциированных белков, кодируемых генами, которые наиболее сильно реагируют на засуху (например, у *Malus*, *Solanum lycopersicum*, *Gossypium hirsutum*, *Cucumis sativus*), чаще всего по сравнению с другими типами доменов цинковых пальцев встречается домен типа A20-AN1. Анализ сходства последовательностей стресс-ассоциированных белков и уровней экспрессии кодирующих их генов в условиях засухи у разных видов растений (яблони, хлопчатника, томата и огурца) позволяет предположить, что у каждого вида эволюция механизмов адаптации, включающих гены, кодирующие SAP, происходила независимо и, вероятнее всего, после выделения этих видов от общего предка. Полученные результаты позволяют уточнить роль отдельных генов, кодирующих SAP, в формировании стрессового ответа яблони на воздействие засухи.

Ключевые слова: SAP, *Malus*, домен типа цинковые пальцы A20-AN1, экспрессия, qPCR, стресс

Для цитирования: Кузмицкая, П. В. Влияние дефицита влаги на экспрессию генов, кодирующих стресс-ассоциированные белки яблони / П. В. Кузмицкая, Е. С. Королева, О. Ю. Урбанович // Вес. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. биол. наук. – 2024. – Т. 69, № 1. – С. 36–46. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2024-69-1-36-46>

Polina V. Kuzmitskaya, Katsiaryna S. Karaleva, Oksana Yu. Urbanovich

Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

EFFECT OF MOISTURE DEFICIENCY ON THE APPLE STRESS-ASSOCIATED PROTEINS EXPRESSION LEVEL

Abstract. In plants, stress-associated proteins (SAP) are involved in response to adverse biotic and abiotic factors. In order to study the drought effect on changes in the SAP expression level in apple trees and their involvement in stress response, an expression level of fourteen genes belonging to this family was analyzed using qPCR. Their participation in a stress response to drought in the genome of the MM-106 apple tree rootstock was shown. At that, the genes demonstrated a tendency to increase their expression by the fourth hour of drought exposure followed by its decrease by the twenty-fourth hour.

A comparison of the data obtained during the described experiment with the data obtained when modeling drought under milder conditions showed that under more severe drought conditions, an expression of a greater number of gene encoding stress-associated proteins increases, and a more pronounced response occurs. Evaluation of the effect of an identity degree of nucleotide sequences of gene encoding stress-associated proteins on the similarity of their expression profiles under drought exposure did not reveal any direct relationship between the primary structure of genes and the nature of their expression.

In the structure of stress-associated proteins encoded by the genes most strongly response to drought in *Malus*, *Solanum lycopersicum*, *Gossypium hirsutum*, and *Cucumis sativus*, the A20-AN1 type domain occurs more frequently than other types of zinc finger domains. Analysis of the similarity of stress-associated protein sequences and the expression levels of genes encoding them under drought conditions in different plant species (apple, cotton, tomato, and cucumber) suggests that in each species, the evolution of adaptation mechanisms, including SAP encoding genes, occurred independently and, most likely,

after separation of those species from their common ancestor. The results obtained will make it possible to clarify the role of individual genes, encoding SAP, in the formation of an apple stress response to the drought effect.

Keywords: SAP, *Malus*, A20-AN1 zinc finger domain, expression, qPCR, stress

For citation: Kuzmitskaya P. V., Karaleva K. S., Urbanovich O. Yu. Effect of moisture deficiency on the apple stress-associated protein expression level. *Vestsi Natsyonal'най akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2024, vol. 69, no. 1, pp. 36–46 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2024-69-1-36-46>

Введение. Неблагоприятные абиотические факторы, такие как экстремальные температуры, засоление, засуха, оказывают значительное влияние на рост и развитие растений, снижают их продуктивность и могут угрожать продовольственной безопасности [1]. Чтобы противостоять воздействию различных факторов окружающей среды и адаптироваться к ним, растения вырабатывают сложные молекулярные механизмы, которые регулируют уровни транскрипции ряда генов и, таким образом, дополнительно контролируют сигнальные сети, участвующие в стрессовых ответах. Установлено, что при передаче сигналов ответа на стресс включается большое количество чувствительных к стрессу генов [2–5], кодирующих функциональные и регуляторные белки. К ним относятся белки, непосредственно участвующие в защите клеток от повреждений и в поддержании их жизнеспособности, такие как шапероны, белки позднего эмбриогенеза, осмотины, белки-антифризы, мРНК-связывающие белки, детоксификационные ферменты, транспортеры, белки, задействованные в транспортировке липидов, ферменты, участвующие в биосинтезе осмопротекторов и др., а также транскрипционные факторы [6]. Среди последних у яблони известны NAC [7], MYB [8], DREB [9], SnRK [10].

В последние годы SAP (stress-associated proteins) признаны одними из ключевых молекулярных факторов, которые участвуют в опосредованной регуляции развития растений и формировании стрессовых реакций [11]. С помощью технологии высокопроизводительного секвенирования генома и последующего биоинформатического анализа полученных последовательностей удалось идентифицировать гены, кодирующие SAP, у ряда растений: *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa* [12], *Gossypium hirsutum* [13], *Solanum lycopersicum* [14], *Populus euphratica* [15], *Ricinus communis* [16] и др. SAP относят к семейству белков, содержащих в своей структуре домены типа цинковых пальцев: N-концевой A-20 домен в комбинации с AN1 доменом и/или Cys2-His2 домен на C-конце [17]. В зависимости от наличия A20, AN1 или C2H2 доменов цинковых пальцев различают пять типов представителей семейства SAP. К типу I относят A20-AN1, в структуре домена которого имеется один A20 и один AN1 домен типа цинковых пальцев; к типу II – AN1, который содержит только один AN1 домен типа I; к типу III – AN1-AN1, который содержит два домена AN1 типа II; к типу IV – AN1-AN1-C2H2-C2H2, который содержит два домена AN1 типа II и два домена C2H2; к типу V – AN1-AN1-C2H2, который содержит два домена AN1 типа II и один домен C2H2. Наиболее распространенным типом SAP является A20-AN1 [18].

У растений гены, кодирующие SAP, участвуют в ответе на действие различных абиотических и биотических стрессовых факторов. Так, у риса наблюдается повышенная экспрессия гена *OsSAP1* в ответ на действие засухи, холода, засоления и др. [19]. У тополя *P. euphratica* все гены, кодирующие SAP, отличаются повышенным уровнем экспрессии в ответ на действие засухи, засоления и повышенной температуры [15]. В последнее время данная группа генов активно изучается.

Яблоня является широко культивируемой плодовой культурой во всем мире, поэтому изучение генетических механизмов, обеспечивающих ее устойчивость к стрессовым факторам, имеет не только научное, но и прикладное значение, поскольку может способствовать формированию новых подходов к повышению адаптационной способности создаваемых сортов. Ранее нами идентифицированы гены, кодирующие SAP, в геноме *Malus domestica* сорта Golden Delicious [20]. Параллельно та же работа была проведена Dong с соавт. [21]. Авторы проанализировали профили экспрессии SAP в ответ на действие засухи, которая моделировалась в достаточно мягких условиях путем приостановки полива растений до 8 дней с отбором проб на 0, 4 и 8-е сутки воздействия [21]. При этом экспрессия кодирующих SAP генов в более жестких условиях воздействия не изучалась.

Цель данной работы – анализ профилей экспрессии генов яблони, кодирующих SAP, в моделирующих засуху условиях.

Материалы и методы исследования. Аминокислотные последовательности белков SAP были получены из соответствующих баз данных: для *Cucumis sativus* – CuGenDB (<http://cucurbitgenomics.org/>), для *Malus domestica* – GDR (<https://www.rosaceae.org/>), для *Gossypium hirsutum* – Cotton research institute (<https://www.cicr.org.in/>), для *Solanum lycopersicum* – UniProt (<https://www.uniprot.org/>). Множественное выравнивание аминокислотных последовательностей приведенных выше культур осуществляли с помощью MEGA X, применяя алгоритм CLUSTALW [22], филогенетический анализ проводили с помощью MegaX [23], используя метод объединения ближайших соседей.

Исследовали клоновые подвои яблони сорта ММ-106. Данный подвой характеризуется средней морозостойкостью и низкой устойчивостью к засухе. Подвои выращивали в условиях длинного светового дня 16ч/8ч (день/ночь) при температуре 22 °С. Для изучения экспрессии генов, кодирующих SAP, растения были разделены на две группы, одна из которых, контрольная, находилась в описанных выше условиях, а вторая была подвергнута действию засухи путем помещения сухих корней на фильтровальную бумагу. При этом полив растений не проводили. Каждая группа была представлена тремя деревьями. Отбор листьев осуществляли в 0-й и к 2, 4, 24-му часу. Отбор в 0-й час производили непосредственно после воздействия стрессовых факторов на растения, до этого находившиеся в контрольных условиях. Отобранные листья незамедлительно замораживали в жидком азоте.

**Олигонуклеотиды, используемые в качестве праймеров при постановке ПЦР
в режиме реального времени**

Oligonucleotides used as primers when performing real-time PCR

Название гена	Праймеры для qRT-PCR
<i>MdSAP1</i> (MD01G1186300)	F: GCAGTTTGCTAAGCCTGCAGCC R: ACCCCTCATTGTCTCAAACCTCCACT
<i>MdSAP2</i> (MD02G1204500)	F: TGACAGAGCGTCCCTGTCTGC R: CCATGGCGGACTCTGCCCTC
<i>MdSAP3</i> (MD02G1204600)	F: TGTCACCCTTGACAGAGCGGG R: TTCAGTGCCGCTGTGGTGGT
<i>MdSAP4</i> (MD02G1314600)	F: GCGTCAACAACGCGGCGTC R: TTACGGCAGGTCTCGGCAGC
<i>MdSAP6</i> (MD07G1007300)	F: GCGTCAACAACGCGGCGTC R: CCGCGGACGAAGACGACGAT
<i>MdSAP8</i> (MD07G1258500)	F: GCAGTTTGCTAAGCCTGCAGCC R: CACACTCAGTGAAGCTCC
<i>MdSAP11</i> (MD12G1023200)	F: GATCGCCAGGAGCAACCCGT R: AGATCGACGGTCCGCGTGG
<i>MdSAP12</i> (MD14G1020200)	F: GATCGCCAGGAGCAACCCGT R: TCAGTTCCGCGGACAGCCTG
<i>MdSAP16</i> (MD12G1065100)	F: GAATGGCGGCGGCAGCAG R: CCAACGCGTTTCGGCAAGT
<i>MdSAP17</i> (MD14G1065100)	F: GCGTCGATGGCAGCAGCAAC R: CCAACGCGTTTCGGCAAGT
<i>MdSAP18</i> (MD09G1039300)	F: TTCGCCGGTGCAAGGAGATTC R: GCGGGTAATGGCGTCAGCT
<i>MdSAP19</i> (MD17G1040300)	F: TTCGCCGGTGCAAGGAGATTC R: CGTCGTTGGTGGGGAAGCCT
<i>MdSAP20</i> (MD12G1077300)	F: CCGGGACTACATAATCCCGCCG R: GCGACGTAGCAATGCCTACCCA
<i>MdSAP21</i> (MD14G1070700)	F: AAAACTAGGGCGGCCGTGGC R: GCGACGTAGCAATGCCTACCCA

Примечание. Названия генов даны в соответствии с [20].

Для выделения РНК из замороженных листьев использовали СТАВ-метод [24]. Качество выделенной РНК определяли с помощью электрофореза в агарозном геле. Концентрацию полученной РНК измеряли с помощью прибора NanoDrop (ND-8000 Spectrophotometer, Thermo Scientific), очистку РНК от ДНК – с применением реактивов DNase I, RNase-free (Thermo Scientific, США) в соответствии с протоколом. Построение минус-цепи кДНК проводили с помощью RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific, США) согласно протоколу.

Ранее в исследовании [20] нами определены гены, к которым были разработаны праймеры (см. таблицу) для постановки qPCR. Оценка эффективности этих праймеров по реакции qPCR на матрице кДНК яблони сорта MM-106 показала, что для каждой пары праймеров она входит в диапазон допустимых значений – 90–110 % [25]. По приведенной выше реакции определена специфичность каждой пары праймеров, а график кривых плавления показал наличие одного острого пика, что гарантирует амплификацию уникального фрагмента кДНК. Реакцию амплификации проводили с помощью прибора CFX96 Real Time System (Bio-Rad, США). Конечный объем реакционной смеси составил 20 мкл: qPCRmix-HS SYBR (Евроген) – 4 мкл, праймеры F и R – 1 мкл (5 пмоль/мкл), кДНК – 2 мкл, стерильная деионизированная вода – 12 мкл. Программа амплификации включала предварительную денатурацию при 95 °C (5 мин), затем 38 циклов при 95 °C (20 с), 58 °C (20 с) и 2 °C (20 с). На каждом цикле происходило считывание флуоресценции красителя SYBR-green. В качестве внутреннего контроля был выбран фактор элонгации *Efl-α* [9]. В качестве отрицательного контроля вместо кДНК использовали равное количество деионизированной воды. Для анализа экспрессии генов, кодирующих SAP, в ответ на действие абиотических стрессовых факторов использовали три биологических повтора в каждом из экспериментальных условий. Подсчет относительного уровня экспрессии исследуемых генов осуществляли по методу $2^{-(\Delta\Delta CT)}$ [26].

Результаты и их обсуждение. В предыдущей работе [20] нами *in silico* проведена полногеномная идентификация генов, кодирующих SAP, в геноме яблони Golden Delicious. Анализ последовательностей, расположенных непосредственно перед этими генами, позволяет предположить, что экспрессия SAP у яблони, как и у других изученных растений, будет изменяться в ответ на стресс [13–16, 19].

Для оценки изменения уровня экспрессии 14 генов, кодирующих SAP в геноме яблони, в условиях действия стресса, вызванного нехваткой влаги, корневую систему участвовавших в эксперименте растений извлекали из земли. Профили экспрессии генов яблони сорта MM-106 в 0-й и к 2, 4 и 24-му часу воздействия засухи представлены на рис. 1.

Согласно результатам исследования, уровень экспрессии генов, кодирующих SAP, в условиях пересыхания корневой системы растения ко 2-му часу воздействия по сравнению с точкой начала эксперимента повышается: для *MdSAP12* – с 0,16 до 2,96 (в 18,5 раза), для *MdSAP1* – с 0,11 до 0,96 (в 8,7 раза), для *MdSAP19* – с 0,1 до 0,61 (в 6,1 раза), для *MdSAP4* – с 0,76 до 2,36 (в 3,1 раза). При этом у ряда генов уровень экспрессии не изменялся, а у некоторых – снижался (например, у *MdSAP3* – с 2,42 до 0,79). К 4-му часу воздействия засухи для большинства генов было характерно достижение максимального уровня экспрессии. Для генов *MdSAP21*, *MdSAP19*, *MdSAP6*, *MdSAP4*, *MdSAP12*, *MdSAP2*, *MdSAP20* он увеличился (наиболее значительно у *MdSAP6* и *MdSAP4* – в 12,04 и 9,38 раза соответственно) по сравнению с референсным геном *Efl-α*. К 24-му часу воздействия стрессового фактора наблюдалось снижение уровня экспрессии почти для всех исследуемых генов, кроме *MdSAP3*, у которого он снизился к 2-му и 4-му часу воздействия, а на 24-м увеличился в 6,36 раза, что в 2,62 раза больше его уровня в точке начала эксперимента.

Таким образом, наблюдалась тенденция к максимальному увеличению экспрессии генов, кодирующих SAP, к 4-му часу воздействия засухи с последующим ее снижением к 24-му часу. При этом у отдельных генов (например, *MdSAP4*, *MdSAP6*, *MdSAP12*, *MdSAP19*) уровень экспрессии повышался по сравнению со 2-м часом достаточно резко, а у других (например, *MdSAP1*, *MdSAP20*) – не так значительно. Такую скорость накопления транскриптов можно обосновать структурной организацией генов, кодирующих SAP, для которых характерна безинтронная или малоинтронная организация генов у разных видов. Результатом этого является быстрое накопление транскрипта благодаря уменьшению посттранскрипционной обработки [17]. Уровни экспрессии

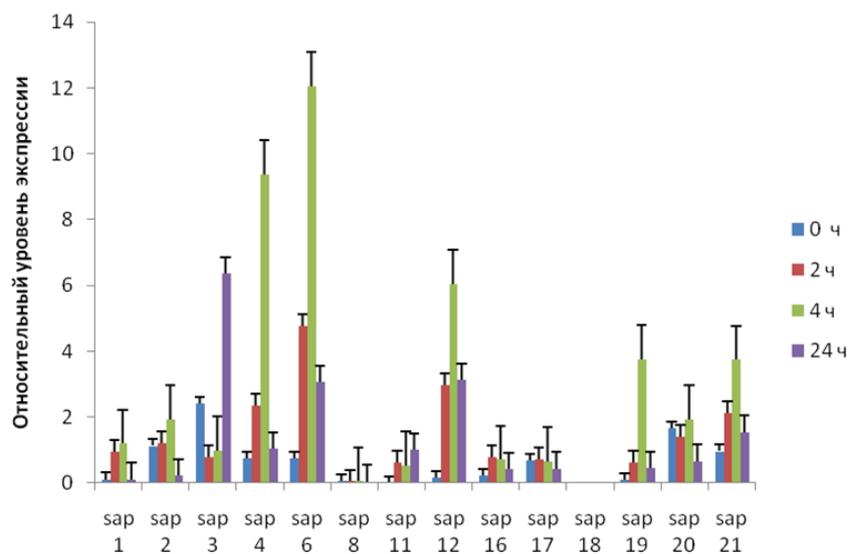


Рис. 1. Профиль экспрессии генов яблони сорта ММ-106, кодирующих SAP, в условиях водного дефицита с точками измерения 0, 2, 4 и 24 ч. Данные нормализованы относительно гена домашнего хозяйства яблони *Ef1-α*.

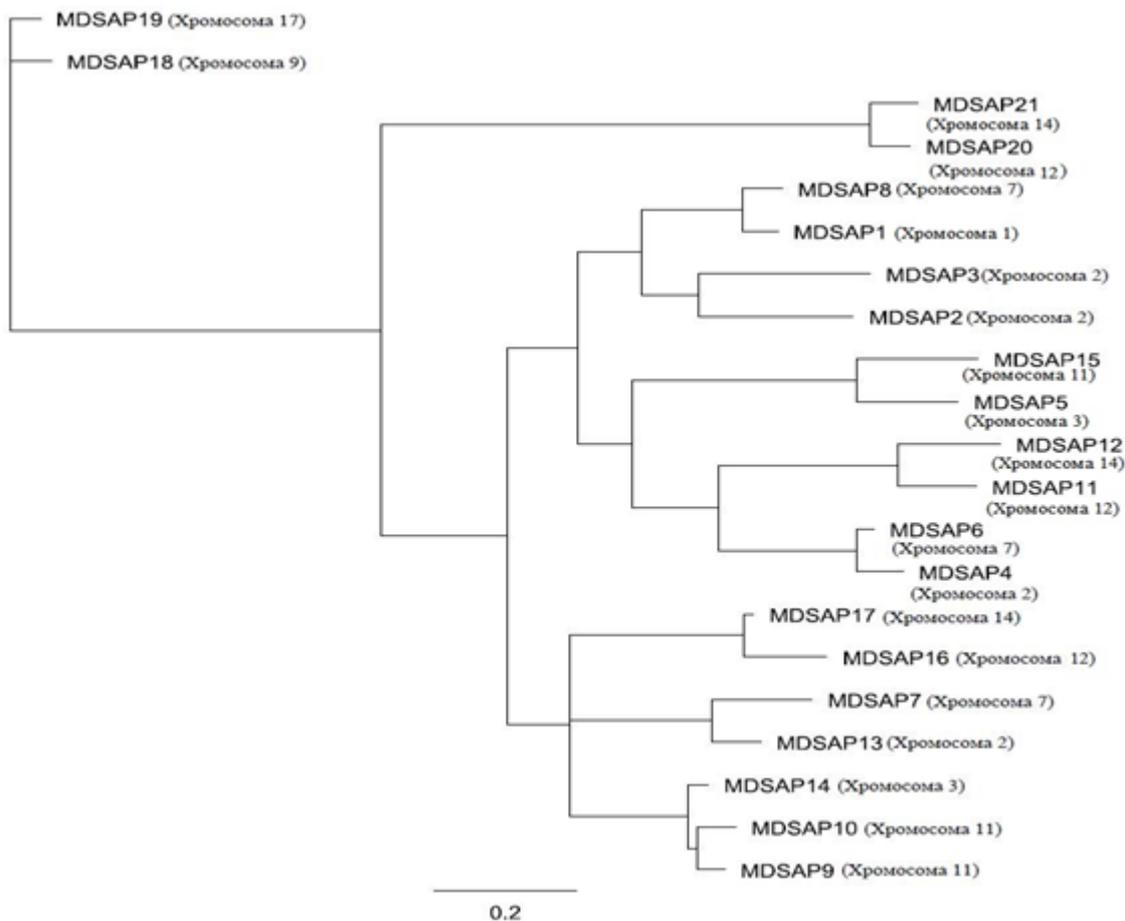
Вертикальные полосы отображают стандартную ошибку среднего. Уровень значимости – $\alpha = 0,05$

Fig. 1. MdTH gene expression profiles under the drought condition on the MM-106 apple variety with measurement points at 0, 2nd, 4th, and 24th hour. The data were normalised in relation to the apple housekeeping gene *Ef1-α*. The vertical stripes show the standard error of the mean. The significance value is $\alpha = 0.05$

отдельных генов (например, *MdSAP8*, *MdSAP17*) мало изменялись при воздействии засухи. Один из генов (*MdSAP18*) не экспрессировался ни в одной точке эксперимента.

На следующем этапе работы оценено влияние степени идентичности белковых последовательностей стресс-ассоциированных белков, полученных с помощью трансляции *in silico*, на сходство их профилей экспрессии при воздействии засухи. Филогенетическое древо, отражающее степень идентичности последовательностей, представлено на рис. 2. Филогенетический анализ показал, что среди SAP яблони можно выделить пары последовательностей с высокой степенью идентичности между собой. Таким образом, 14 изучаемых нами генов были разделены на 7 пар.

Следует отметить значительное увеличение экспрессии обоих генов в парах *MdSAP4* и *MdSAP6*, при этом их уровень экспрессии повышался ко 2-му часу эксперимента, резко повышался к 4-му часу и снижался к 24-му часу, оставаясь выше, чем в 0-й точке. В паре *MdSAP20* и *MdSAP21* уровень экспрессии первого гена изменялся незначительно к 2-му и 4-му часу и значительно снижался к 24-му часу по сравнению с первой точкой отбора проб, в то время как у второго гена наблюдалось более значительное повышение уровня экспрессии. В паре *MdSAP18* и *MdSAP19* первый ген не экспрессировался, в то время как *MdSAP19* показал значительное увеличение экспрессии к 4-му часу воздействия засухи. В паре *MdSAP11* и *MdSAP12* уровень экспрессии первого гена был максимальным к 24-му часу воздействия, в то время как уровень экспрессии *MdSAP12* был максимальным к 4-му часу воздействия и снизился к 24-му часу, однако все равно оказался выше уровня в начальной точке эксперимента. В паре *MdSAP1* и *MdSAP8* экспрессия первого гена значительно увеличилась ко 2-му часу, еще немного повысилась к 4-му часу, после чего снизилась и к 24-му часу была такой же, что и в начале эксперимента, в то время как уровень экспрессии *MdSAP8* практически не изменился. В паре генов *MdSAP16* и *MdSAP17* уровень экспрессии первого являлся максимальным ко 2-му часу воздействия, хотя по-прежнему оставался невысоким, а у *MdSAP17* – мало изменялся на протяжении всего эксперимента, кардинальных различий в уровнях экспрессии не обнаружено. В паре *MdSAP2* и *MdSAP3* ген *MdSAP3* показал отличное от всех генов значительное увеличение экспрессии ко 24-му часу воздействия засухи. Таким образом, не наблюдается связи между характером экспрессии генов, кодирующих стресс-ассоциированные белки у яблони, в условиях водного дефицита и степенью идентичности их последовательностей.

Рис. 2. Филогенетический анализ последовательностей 14 SAP *Malus domestica*Fig. 2. Phylogenetic tree of 14 SAP *Malus domestica*

Сравнение полученных нами данных об экспрессии генов, кодирующих SAP яблони, в условиях засухи, обусловленной пересыханием корневой системы, с данными, полученными Dong с соавт. [21], при изучении засухи в более мягких условиях (прекращение полива растений на 8 дней) показало, что в смоделированных нами условиях повышенной экспрессии на водный дефицит отреагировало большее количество генов, чем в эксперименте [21]. Следует отметить, что в этих двух экспериментах были использованы разные сорта яблони (подвой MM-106 и сорт Golden Delicious на подвое *M. hupehensis*), что не исключает индивидуальной реакции генотипов. Согласно полученным нами результатам, можно отметить пять кодирующих стресс-ассоциированные белки генов (*MdSAP21*, *MdSAP19*, *MdSAP6*, *MdSAP4*, *MdSAP12*), относительные уровни экспрессии которых превысили значение 2 и составили 3,74; 3,76; 12,04; 9,38; 6,05 соответственно (здесь и далее – классификация генов согласно [20]). В работе Dong с соавт. [21] отмечены повышенные уровни экспрессии для трех генов (*MdSAP7*, *MdSAP21*, *MdSAP19*), относительные значения которых составили приблизительно 5,5; 3,5; 2,2 соответственно [21].

Таким образом, изменение условий эксперимента по моделированию засухи от приостановки полива до пересыхания корневой системы растений, которое оказало губительное воздействие на растения (яблоням так и не удалось восстановиться при возобновлении полива), привело к повышению экспрессии генов *MdSAP3*, *MdSAP4*, *MdSAP12*, *MdSAP6*, *MdSAP19*, *MdSAP21*. Следует отметить, что в более жестких условиях засухи экспрессия у большего количества генов, кодирующих стресс-ассоциированные белки, повышается и имеет место более выраженный ответ по сравнению с более мягкими условиями.

На заключительном этапе работы проведена оценка того, насколько уровни экспрессии в стрессовых условиях генов-гомологов, кодирующих SAP у разных видов растений, будут зависеть от

филогенетических отношений кодируемых ими белков. Нами проведено сравнение относительных уровней экспрессии генов яблони и других двудольных растений: огурца [11], томата [14], хлопчатника [13] в условиях засухи. Филогенетическое древо, отражающее взаимосвязи SAP этих видов, позволило выделить четыре группы последовательностей у анализируемых видов (рис. 3).

Первая группа представлена 17 последовательностями четырех разных культур: хлопка – 3, томата – 4, огурца – 3, яблони – 7. Для 12 представителей группы характерен тип домена цинковых пальцев A20-AN1, однако для ряда представителей яблони, огурца характерен тип домена цинковых пальцев AN1. Сопоставление сходства структурной организации белков с относительными уровнями экспрессии кодирующих их генов в условиях действия засухи позволяет выявить некоторые закономерности. В первой группе последовательностей можно выделить четыре активно экспрессируемых гена: один у хлопчатника (*GhSAP16*), второй у огурца (*CsSAP1*) и два других у томата (*SISAP4* и *SISAP3*), для белков всех перечисленных генов, кодирующих SAP, характерно наличие A20-AN1 домена. Ни один из представленных генов в первой группе не отличается высоким или максимальным уровнем экспрессии относительно других генов в каждом из экспериментов [11, 13, 14, 27].

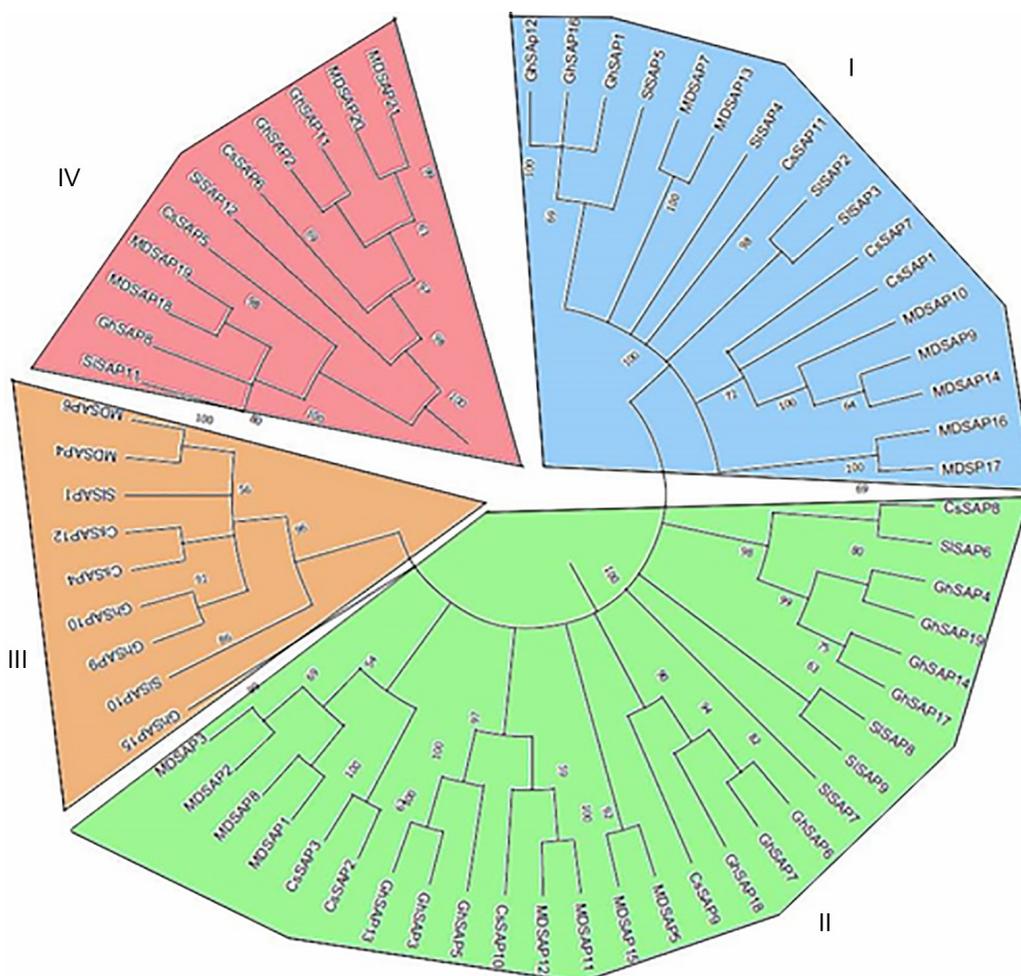


Рис. 3. Схема филогенетических взаимоотношений SAP четырех культур (*Malus domestica* – MD, *Solanum lycopersicum* – Sl, *Gossypium hirsutum* – Gh, *Cucumis sativus* – Cs). Голубым цветом изображена первая группа, зеленым – вторая, оранжевым – третья, розовым – четвертая

Fig. 3. Phylogenetic tree of four cultures SAP (*Malus domestica* – MD, *Solanum lycopersicum* – Sl, *Gossypium hirsutum* – Gh, *Cucumis sativus* – Cs). The first group is in blue color, the second group is in green color, the third group is in orange, the fourth group is in pink

В самой многочисленной второй группе (выделена на рис. 3 зеленым цветом) 27 последовательностей, среди которых у огурца – 5, у томата – 4, у хлопка – 10, у яблони – 8. Для 25 из них характерен тип цинковых пальцев A20-AN1 и лишь для 2 – AN1 (огурца, яблони). Среди них выделено 8 генов, активно экспрессируемых в условиях засухи, 2 из которых – у хлопчатника (*GhSAP17*, *GhSAP6*), 4 – у яблони (*MdSAP1*, *MdSAP3*, *MdSAP11*, *MdSAP12*), 1 – у томата (*SISAP6*), 1 – у огурца (*CsSAP10*). Для белков, кодируемыми этими генами, характерен домен A20-AN1. Причем в эту группу входит ген хлопчатника *GhSAP6*, имеющий максимальный уровень экспрессии среди других генов, кодирующих SAP, у хлопчатника.

Для самой малочисленной третьей группы (выделена на рис. 3 оранжевым цветом), представленной 9 последовательностями, из которых у хлопка – 3, у томата – 2, у огурца – 2, у яблони – 2, характерен, как и для двух предыдущих групп, тип цинковых пальцев A20-AN1 и лишь для двух – AN1 (хлопка, томата). В ней были обнаружены три активно экспрессируемых в условиях засухи гена, два из которых у яблони (*MdSAP6*, *MdSAP4*), один у хлопчатника (*GhSAP9*), причем оба гена яблони проявляли максимальный уровень экспрессии относительно других генов, кодирующих SAP, у яблони. Для представленных последовательностей белков SAP характерен домен A20-AN1.

В состав четвертой группы (выделена на рис. 3 розовым цветом) входит 11 последовательностей, среди которых у томата – 2, у хлопка – 3, у яблони – 4, у огурца – 2. Эта группа отличается нетипичной комбинацией доменов типа цинковых пальцев: AN1-AN1 для шести последовательностей, AN1-C2H2 для двух последовательностей яблони, AN1-AN1-C2H2-C2H2 для двух последовательностей хлопка. Приведенные комбинации доменов типа цинковых пальцев, характерные для данной группы, не встречаются в описанных выше группах, поэтому можно предположить, что эта группа эволюционно отдалена от трех ранее перечисленных, а их гомология опосредована наличием общего домена AN1, который, как предполагается, является более древним [9]. В четвертой группе количество активно экспрессируемых генов, кодирующих SAP, представлено четырьмя последовательностями. Так, у яблони значительный уровень экспрессии показали *MdSAP19*, у огурца – *CsSAP1*, *CsSAP6* [11, 14], у томата – *SISAP11* [11, 14]. Для генов, кодирующих SAP, которые входят в эту группу, характерна нетипичная комбинация доменов: для *MdSAP19* яблони, *SISAP11* томата, *CsSAP5* огурца – AN1-AN1, для *CsSAP6* огурца – AN1-AN1-C2H2-C2H2. Два гена из этой группы, кодирующих SAP (*CsSAP5* огурца и *SISAP11* томата), показали максимальный уровень экспрессии относительно других генов в соответствующих экспериментах [11, 14].

Из приведенных результатов видно, что в каждой из групп, кроме первой, был найден активно экспрессируемый ген с максимальным уровнем экспрессии среди генов, кодирующих SAP, для соответствующей культуры. Почти для всех указанных активно экспрессируемых генов характерно наличие домена A20-AN1. Что касается яблони, то гены *MdSAP4* и *MdSAP6* с максимальным уровнем экспрессии относятся к третьей группе, а гены *MdSAP11*, *MdSAP12*, которые характеризуются как активно экспрессируемые с увеличением экспрессии через 2 ч в 18 и 61 раз соответственно, – ко второй группе. Для хлопчатника оба гена со значительным уровнем экспрессии относятся ко второй группе филогенетического дерева. Кодирующие SAP гены томата и огурца с максимальным уровнем экспрессии относятся к четвертой группе и в структуре их белков обнаружен AN1-AN1 домен. У томата гены *SISAP4*, *SISAP3* со значительным уровнем экспрессии относят также к первой группе, для них характерен A20-AN1 домен. Таким образом, анализ сходства последовательностей стресс-ассоциированных белков и уровней экспрессии кодирующих их генов позволяет предположить, что у каждого вида эволюция механизмов адаптации, включающих гены, кодирующие SAP, происходила независимо и, вероятнее всего, после выделения этих видов от общего предка.

Заключение. Анализ профилей экспрессии генов, кодирующих стресс-ассоциированные белки яблони, показал их участие в стрессовом ответе на водный дефицит. Наиболее значительное изменение уровней экспрессии отмечалось у генов *MdSAP3*, *MdSAP4*, *MdSAP12*, *MdSAP6*, *MdSAP19*, *MdSAP21*. При этом наблюдалась тенденция к повышению экспрессии генов к 4-му часу воздействия засухи, с последующим снижением к 24-му часу. У отдельных генов уровень экспрессии повышался по сравнению со 2-м часом достаточно резко, а у других – более плавно.

Эта информация подтверждает предположение о резком повышении уровня транскриптов SAP на ранних стадиях реализации ответа на абиотический стресс с последующим его снижением.

Оценка влияния степени идентичности нуклеотидных последовательностей генов, кодирующих стресс-ассоциированные белки, на сходство их профилей экспрессии не выявила связи между характером экспрессии генов яблони в условиях моделирования засухи и сходством их первичной структуры.

Анализ сходства последовательностей стресс-ассоциированных белков и уровней экспрессии кодирующих их генов у разных видов растений (яблони, хлопчатника, томата и огурца) на примере засухи позволяет предположить, что у каждого вида эволюция механизмов адаптации, включающих гены, кодирующие SAP, происходила независимо и, вероятнее всего, после выделения этих видов от общего предка. В структуре стресс-ассоциированных белков, кодируемых генами, наиболее сильно реагируют на засуху *Malus*, *Solanum lycopersicum*, *Gossypium hirsutum*, *Cucumis sativus*, чаще по сравнению с другими типами доменов цинковых пальцев встречается домен типа A20-AN1.

Полученные результаты позволяют уточнить роль отдельных генов, кодирующих SAP, в формировании стрессового ответа яблони на воздействие засухи.

Список использованных источников

1. Genomic analysis of stress associated proteins in soybean and the role of GmSAP16 in abiotic stress responses in Arabidopsis and soybean / X.-Z. Zhang [et al.] // Front. Plant Sci. – 2019. – Vol. 10. – Art. 1453. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01453>
2. Gene networks involved in drought stress response and tolerance / K. Shinozaki, K. Yamaguchi-Shinozaki // J. Exp. Bot. – 2007. – Vol. 58, N 2. – P. 221–227. <https://doi.org/10.1093/jxb/erl164>
3. Changes in oligosaccharide content and antioxidant enzyme activities in developing bean seeds as related to acquisition of drying tolerance and seed quality / C. Bailly [et al.] // J. Exp. Bot. – 2001. – Vol. 52, N 357. – P. 701–708. <https://doi.org/10.1093/jexbot/52.357.701>
4. Expression profiling and bioinformatic analyses of a novel stress-regulated multispansing transmembrane protein family from cereals and Arabidopsis / G. Breton [et al.] // Plant Physiol. – 2003. – Vol. 132, N 1. – P. 64–74. <https://doi.org/10.1104/pp.102.015255>
5. A novel LEA gene from *Tamarix androssowii* confers drought tolerance in transgenic tobacco / Y. Wang [et al.] // Plant Sci. – 2006. – Vol. 171, N 6. – P. 655–662. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2006.06.011>
6. Li, K.-Q. Identification of differentially expressed genes related to dehydration resistance in a highly drought-tolerant pear, *Pyrus betulaefolia*, as through RNA-Seq / K.-Q. Li, X.-Y. Xu, X.-S. Huang // PloS ONE. – 2016. – Vol. 11, N 2. – P. e0149352. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0149352>
7. An apple (*Malus domestica*) NAC transcription factor enhances drought tolerance in transgenic apple plants / D. Jia [et al.] // Plant Physiol. Biochem. – 2019. – Vol. 139. – P. 504–512. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2019.04.011>
8. R2R3-MYB transcription factor Md MYB 23 is involved in the cold tolerance and proanthocyanidin accumulation in apple / J. P. An [et al.] // Plant J. – 2018. – Vol. 96, N 3. – P. 562–577. <https://doi.org/10.1111/tpj.14050>
9. Genome-wide analysis and expression profiling of the DREB transcription factor gene family in *Malus* under abiotic stress / T. Zhao [et al.] // Mol. Genet. Genomics. – 2012. – Vol. 287, N 5. – P. 423–436. <https://doi.org/10.1007/s00438-012-0687-7>
10. Genome-wide identification and expression profiling of the SnRK2 gene family in *Malus prunifolia* / Y. Shao [et al.] // Gene. – 2014. – Vol. 552, N 1. – P. 87–97. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2014.09.017>
11. Identification and expression analysis of Stress-Associated Proteins (SAPs) containing A20/AN1 zinc finger in cucumber / W. Lai [et al.] // Plants. – 2020. – Vol. 9, N 3. – Art. 400. <https://doi.org/10.3390/plants9030400>
12. Genome-wide analysis of the stress-associated protein (SAP) gene family containing A20/AN1 zinc-finger (s) in rice and their phylogenetic relationship with Arabidopsis / S. Vij, A. K. Tyagi // Mol. Genet. Genomics. – 2006. – Vol. 276, N 6. – P. 565–575. <https://doi.org/10.1007/s00438-006-0165-1>
13. Genome-wide identification and expression analysis of stress-associated proteins (SAPs) containing A20/AN1 zinc finger in cotton / W. Gao [et al.] // Mol. Genet. Genomics. – 2016. – Vol. 291, N 6. – P. 2199–2213. <https://doi.org/10.1007/s00438-016-1252-6>
14. Characterization and phylogenetic analysis of environmental stress-responsive SAP gene family encoding A20/AN1 zinc finger proteins in tomato / A. U. Solanke [et al.] // Mol. Genet. Genomics. – 2009. – Vol. 282, N 2. – P. 153–164. <https://doi.org/10.1007/s00438-009-0455-5>
15. Genome-wide survey and expression analysis of the stress-associated protein gene family in desert poplar, *Populus euphratica* / H. Jia [et al.] // Tree Genet. Genomes. – 2016. – Vol. 12, N 4. – Art. 78. <https://doi.org/10.1007/s11295-016-1033-8>
16. Genomic characterization and expression profiles of stress-associated proteins (SAPs) in castor bean (*Ricinus communis*) / Z. Wang [et al.] // Plant Diversity. – 2020. – Vol. 43, N 2. – P. 152–162. <https://doi.org/10.1016/j.pld.2020.07.010>
17. SAPs as novel regulators of abiotic stress response in plants / J. Giri [et al.] // Bioessays. – 2013. – Vol. 35, N 7. – P. 639–648. <https://doi.org/10.1002/bies.201200181>
18. A stress-associated protein, AtSAP13, from *Arabidopsis thaliana* provides tolerance to multiple abiotic stresses / A. Dixit [et al.] // Plant, Cell Environ. – 2018. – Vol. 41, N 5. – P. 1171–1185. <https://doi.org/10.1111/pce.13103>

19. Mukhopadhyay, A. Overexpression of a zinc-finger protein gene from rice confers tolerance to cold, dehydration, and salt stress in transgenic tobacco / A. Mukhopadhyay, S. Vij, A. K. Tyagi // *Proc. Nat. Acad. Sci.* – 2004. – Vol. 101, N 16. – P. 6309–6314. <https://doi.org/10.1073/pnas.0401572101>
20. Идентификация генов, кодирующих стресс-ассоциированные белки, содержащие домены A20/AN1, в геноме яблони *in silico* и анализ их филогенетических связей / П. В. Кузмицкая, О. Ю. Урбанович, А. В. Кильчевский // *Докл. Нац. акад. наук Беларуси.* – 2018. – Т. 62. – С. 455–462.
21. Genome-wide analysis and cloning of the apple stress-associated protein gene family reveals MdSAP15, which confers tolerance to drought and osmotic stresses in transgenic *Arabidopsis* / Q. Dong [et al.] // *Int. J. Mol. Sci.* – 2018. – Vol. 19, N 9. – Art. 2478. <https://doi.org/10.3390/ijms19092478>
22. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice / J. D. Thompson, D. G. Higgins, T. J. Gibson // *Nucl. Acids Res.* – 1994. – Vol. 22, N 22. – P. 4673–4680. <https://doi.org/10.1093/nar/22.22.4673>
23. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms / S. Kumar [et al.] // *Mol. Biol. Evol.* – 2018. – Vol. 35, N 6. – P. 1547–1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
24. Isolation of high quality RNA from bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) fruit / L. Jaakola [et al.] // *Mol. Biotechnol.* – 2001. – Vol. 19, N 2. – P. 201–203. <https://doi.org/10.1385/MB:19:2:201>
25. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments / S. A. Bustin [et al.] // *Clin. Chem.* – 2009. – Vol. 55, N 4. – P. 611–622. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797>
26. An improvement of the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis / X. Rao [et al.] // *Biostat., Bioinform. Biomath.* – 2013. – Vol. 3, N 3. – P. 71–85.
27. Genome-wide identification and expression analysis of stress-associated proteins (SAPs) containing A20/AN1 zinc finger in cotton / W. Gao [et al.] // *Mol. Genet. Genomics.* – 2016. – Vol. 291, N 6. – P. 2199–2213. <https://doi.org/10.1007/s00438-016-1252-6>

References

1. Zhang X.-Z., Zheng W.-J., Cao X.-Y., Cui X.-Y., Zhao S.-P., Yu T.-F. [et al.]. Genomic analysis of stress associated proteins in soybean and the role of GmSAP16 in abiotic stress responses in *Arabidopsis* and soybean. *Frontiers in Plant Science*, 2019, vol. 10, art. 1453. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01453>
2. Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K. Gene networks involved in drought stress response and tolerance. *Journal of Experimental Botany*, 2007, vol. 58, no. 2, pp. 221–227. <https://doi.org/10.1093/jxb/erl164>
3. Bailly C., Audigier C., Ladonne F., Wagner M. H., Coste F., Corbineau F., Côme D. Changes in oligosaccharide content and antioxidant enzyme activities in developing bean seeds as related to acquisition of drying tolerance and seed quality. *Journal of Experimental Botany*, 2001, vol. 52, no. 357, pp. 701–708. <https://doi.org/10.1093/jexbot/52.357.701>
4. Breton G., Danyluk J., Charron J.-B. F., Sarhan F. Expression profiling and bioinformatic analyses of a novel stress-regulated multispansing transmembrane protein family from cereals and *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 2003, vol. 132, no. 1, pp. 64–74. <https://doi.org/10.1104/pp.102.015255>
5. Wang Y., Jiang J., Zhao X., Liu G., Yang C., Zhan L. A novel LEA gene from *Tamarix androssowii* confers drought tolerance in transgenic tobacco. *Plant Science*, 2006, vol. 171, no. 6, pp. 655–662. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2006.06.011>
6. Li K.-Q., Xu X.-Y., Huang X.-S. Identification of differentially expressed genes related to dehydration resistance in a highly drought-tolerant pear, *Pyrus betulaefolia*, as through RNA-Seq. *PLoS ONE*, 2016, vol. 11, no. 2, p. e0149352. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0149352>
7. Jia D., Jiang Q., van Nocker S., Gong X., Ma F. An apple (*Malus domestica*) NAC transcription factor enhances drought tolerance in transgenic apple plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2019, vol. 139, pp. 504–512. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2019.04.011>
8. An J. P., Li R. Qu F. J., You C. X. Wang, X. F., Hao Y. J. R2R3-MYB transcription factor Md MYB 23 is involved in the cold tolerance and proanthocyanidin accumulation in apple. *Plant Journal*, 2018, vol. 96, no. 2, pp. 562–577. <https://doi.org/10.1111/tpj.14050>
9. Zhao T., Liang, D., Wang P., Liu J., Ma F. Genome-wide analysis and expression profiling of the DREB transcription factor gene family in *Malus* under abiotic stress. *Molecular Genetics and Genomics*, 2012, vol. 287, no. 5, pp. 423–436. <https://doi.org/10.1007/s00438-012-0687-7>
10. Shao Y., Qin Y., Zou Y., Ma F. Genome-wide identification and expression profiling of the SnRK2 gene family in *Malus prunifolia*. *Gene*, 2014, vol. 552, no. 1, pp. 87–97. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2014.09.017>
11. Lai W., Zhou Y., Pan R., Liao L., He J., Liu H., Yang Y., Liu S. Identification and expression analysis of stress-associated proteins (SAPs) containing A20/AN1 zinc finger in cucumber. *Plants*, 2020, vol. 9, no. 3, art. 400. <https://doi.org/10.3390/plants9030400>
12. Vij S., Tyagi A. K. Genome-wide analysis of the stress-associated protein (SAP) gene family containing A20/AN1 zinc-finger (s) in rice and their phylogenetic relationship with *Arabidopsis*. *Molecular Genetics and Genomics*, 2006, vol. 276, no. 6, pp. 565–575. <https://doi.org/10.1007/s00438-006-0165-1>
13. Gao W., Long L., Tian X., Jin J., Liu H., Zhang H., Xu F., Song C. Genome-wide identification and expression analysis of stress-associated proteins (SAPs) containing A20/AN1 zinc finger in cotton. *Molecular Genetics and Genomics*, 2016, vol. 291, no. 6, pp. 2199–2213. <https://doi.org/10.1007/s00438-016-1252-6>
14. Solanke A. U., Sharma M. K., Tyagi A. K., Sharma A. K. Characterization and phylogenetic analysis of environmental stress-responsive SAP gene family encoding A20/AN1 zinc finger proteins in tomato. *Molecular Genetics and Genomics*, 2009, vol. 282, no. 2, pp. 153–164. <https://doi.org/10.1007/s00438-009-0455-5>

15. Jia H., Li J., Zhang J., Ren Y., Hu J., Lu M., Genome-wide survey and expression analysis of the stress-associated protein gene family in desert poplar, *Populus euphratica*. *Tree Genetics and Genomes*, 2016, vol. 12, no. 4, art. 78. <https://doi.org/10.1007/s11295-016-1033-8>
16. Wang Z., Kuang J., Han B., Chen S., Liu A. Genomic characterization and expression profiles of stress-associated proteins (SAPs) in castor bean (*Ricinus communis*). *Plant Diversity*, 2020, vol. 43, no. 2, pp. 152–162. <https://doi.org/10.1016/j.pld.2020.07.010>
17. Giri J., Dansana P. K., Kothari K. S., Sharma G., Vij S., Tyagi A. K. SAPs as novel regulators of abiotic stress response in plants. *Bioessays*, 2013, vol. 35, no. 7, pp. 639–648. <https://doi.org/10.1002/bies.201200181>
18. Dixit A., Tomar P., Vaine E., Abdullah H., Hazen S., Dhankher O. P. A stress-associated protein, AtSAP13, from *Arabidopsis thaliana* provides tolerance to multiple abiotic stresses. *Plant, Cell & Environment*, 2018, vol. 41, no. 5, pp. 1171–1185. <https://doi.org/10.1111/pce.13103>
19. Mukhopadhyay A., Vij S., Tyagi A. K. Overexpression of a zinc-finger protein gene from rice confers tolerance to cold, dehydration, and salt stress in transgenic tobacco. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2004, vol. 101, no. 16, pp. 6309–6314. <https://doi.org/10.1073/pnas.0401572101>
20. Kuzmitskaya P. V., Urbanovich O. Yu., Kil'chevskii A. V. Identification of genes encoding stress-associated proteins containing the domains A20/AN1 in the apple genome in silico and analysis of their phylogenetic relationship. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi = Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2018, no. 62, pp. 455–462 (in Russian).
21. Dong Q., Duan D., Zhao S., Xu B., Luo J., Wang Q. [et al.]. Genome-wide analysis and cloning of the apple stress-associated protein gene family reveals MdSAP15, which confers tolerance to drought and osmotic stresses in transgenic *Arabidopsis*. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, vol. 19, no. 9, art. 2478. <https://doi.org/10.3390/ijms19092478>
22. Thompson J. D., Higgins D. G., Gibson T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 1994, vol. 22, no. 22, pp. 4673–4680. <https://doi.org/10.1093/nar/22.22.4673>
23. Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., Tamura K. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 2018, vol. 35, no. 6, pp. 1547–1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
24. Jaakola L., Pirttilä A. M., Halonen M., Hohtola A. Isolation of high quality RNA from bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) fruit. *Molecular Biotechnology*, 2001, vol. 19, no. 2, pp. 201–203. <https://doi.org/10.1385/MB:19:2:201>
25. Bustin S. A., Benes V., Garson J. A., Hellemans J., Huggett J., Kubista M. [et al.]. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry*, 2009, vol. 55, no. 4, pp. 611–622. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797>
26. Rao X., Huang X., Zhou Z., Lin X. An improvement of the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis. *Bioinformatics and Biomathematics*, 2013, vol. 3, no. 3, pp. 71–85.
27. Gao W., Long L., Tian X., Jin J., Liu H., Zhang H., Xu F., Song C. Genome-wide identification and expression analysis of stress-associated proteins (SAPs) containing A20/AN1 zinc finger in cotton. *Molecular Genetics and Genomics*, 2016, vol. 291, no. 6, pp. 2199–2213. <https://doi.org/10.1007/s00438-016-1252-6>

Информация об авторах

Кузмицкая Полина Викторовна – канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник. Институт генетики и цитологии НАН Беларуси (ул. Ф. Скорины, 34, 220141, г. Минск, Республика Беларусь). <https://orcid.org/0000-0002-1929-4315>. E-mail: p.kuzmitskaya@igc.by

Королева Екатерина Сергеевна – мл. науч. сотрудник. Институт генетики и цитологии НАН Беларуси (ул. Ф. Скорины, 34, 220141, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: e.koroleva@igc.by

Урбанович Оксана Юрьевна – д-р биол. наук, доцент, заведующий лабораторией. Институт генетики и цитологии НАН Беларуси (ул. Ф. Скорины, 34, 220141, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: o.urbanovich@igc.by

Information about the authors

Polina V. Kuzmitskaya – Ph. D. (Biol.), Senior Researcher. Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus (34, F. Skoriny Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). <https://orcid.org/0000-0002-1929-4315>. E-mail: p.kuzmitskaya@igc.by

Katsiaryna S. Karaleva – Junior Researcher. Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus (34, F. Skoriny Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: e.koroleva@igc.by

Oksana Yu. Urbanovich – D. Sc. (Biol.), Associate Professor, Head of the Laboratory. Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus (34, F. Skoriny Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: o.urbanovich@igc.by