

УДК 632.4:630\*165.3

**С. В. Пантелеев**, кандидат биологических наук,  
старший научный сотрудник (Институт леса НАН Беларуси);

**О. Ю. Баранов**, кандидат биологических наук,  
ведущий научный сотрудник (Институт леса НАН Беларуси)

### **ОСНОВНЫЕ ПРИНЦИПЫ ФОРМИРОВАНИЯ ИНФОРМАЦИОННО-АНАЛИТИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ ВИДОВОЙ ПАСПОРТИЗАЦИИ ФИТОПАТОГЕННЫХ ГРИБОВ В ЛЕСНЫХ ПИТОМНИКАХ**

В статье описываются принципы формирования информационно-аналитической системы видовой паспорттизации фитопатогенных грибов в лесных питомниках на основании использования методов ДНК-анализа. Информационно-аналитическая система представлена в виде электронной базы данных, характеризующейся оперативным доступом к массивам структурированной информации по фитопатогенным грибам и снабженной средствами навигации и поиска. Обозначены объекты, используемые для видовой идентификации грибов, и основные критерии их выбора в качестве ДНК-маркеров: фрагмент рДНК, содержащий внутренние транскрибируемые спейсеры 1, 2 (ITS1 и ITS2) и ген 5,8S рРНК; фрагмент гена  $\beta$ -тубулина ( $\beta$ -tub); фрагмент гена, кодирующего белок eEF-1 $\alpha$ .

In the article the authors describe the principles of information-analytical system certification species of pathogenic fungi in forest nurseries use methods based on DNA analysis. Information-analytical system is presented in the form of an electronic database, which is characterized by prompt access to arrays of structured information on phytopathogenic fungi and is equipped with navigation and search. The authors identified objects that used for species identification of fungi and basic criteria for their selection as DNA markers: the rDNA fragment containing the internal transcribed spacer 1 and 2 (ITS1, ITS2) and 5,8S rRNA gene, a gene fragment  $\beta$ -tubulin ( $\beta$ -tub); gene fragment that encodes a protein eEF-1 $\alpha$ .

**Введение.** В последнее десятилетие в сфере народного хозяйства активно внедряются информационные технологии, включающие создание электронных баз данных и библиотек. Это связано с тем, что по сравнению с другими ресурсами электронные информационно-аналитические системы характеризуются оперативным доступом к массивам структурированной информации, снабженной средствами навигации и поиска. С использованием данных технологий особую актуальность приобретает автоматизация современных методов исследования в хозяйственно ценных отраслях народного хозяйства.

Широкое развитие данное направление получило в медицине. Так, были разработаны крупные электронные базы данных в области клинической практики: Кокрановская библиотека [1], EBSCO: Medical trial [2], HINARI (Health InterNetwork Access to Research Initiative) [3] и др.

Развитие генетических методов анализа сопровождалось созданием библиотек широкого профиля – международных генных банков, содержащих генетическую информацию о представителях всех царств живой природы: NCBI (National Center for Biotechnology Information) [4], Celera [5], Ensemble [6], UCSC Genome [7].

В лесном хозяйстве в последние годы внедряются методы молекулярно-генетического анализа, позволяющие проводить диагностику фитозаболеваний на ранних стадиях их развития. Внедрение методов молекулярно-генети-

ческого маркирования в области лесной фитопатологии также требует использования современных информационных технологий, что вызвано необходимостью обработки данных, связанных с анализом нуклеотидной структуры диагностических локусов фитопатогенов.

Цель работы – создание электронной автоматизированной информационно-аналитической системы «Молекулярно-генетический атлас возбудителей грибных болезней лесных древесных видов», основанной на использовании STS- и RFLP-маркеров. Преимуществами ДНК-маркеров перед остальными группами методов являются ранняя диагностика болезней, точность определения и быстрота выполнения анализов.

**Основная часть.** Исходная база данных для информационно-аналитической системы видовой паспорттизации фитопатогенных грибов основана на результатах исследований, проведенных в лаборатории генетики и биотехнологии Института леса НАН Беларуси, а также нуклеотидных последовательностях, представленных в геномном банке Национального центра биотехнологической информации (NCBI, США).

«Молекулярно-генетический атлас возбудителей грибных болезней лесных древесных видов» представляет электронную базу данных, позволяющую хранить структурированную информацию о патогенной грибной микрофлоре древесных пород. Информационное хранилище содержит приведенные к единому

формату данные: биологические характеристики и генетические паспорта для проведения молекулярно-генетической идентификации вида возбудителя. Данные в хранилище доступны только для чтения.

Для создания базы данных использовалась среда разработки Microsoft Visual Studio 6.0 для операционных систем Windows 9x/NT/Me/2000/XP/Vista/Seven.

Структура базы представлена в виде схемы.



Структура информационно-аналитической системы «Молекулярно-генетический атлас возбудителей грибных болезней лесных древесных видов»

Программа открывается в стандартном виде окна приложения Windows. Вход в базу данных осуществляется через интерфейс. Основное программное меню содержит элементы входа/выхода, а также доступ в редактор базы.

При входе в базу основной раздел представлен формой многофункционального поиска в виде трех отдельных окон:

- 1) фитопатогенные грибы;
- 2) поражаемые породы;
- 3) поиск по генетической структуре.

Окно «Фитопатогенные грибы» представляет собой поисковую систему в виде алфавитного указателя фитопатогенных грибов. Назначением раздела служит оперативный поиск видов согласно латинской номенклатуре с учетом устаревших и современных названий. Имеется функция перехода к списку всех видов в хранилище данных, минуя алфавитный указатель.

С данного раздела можно осуществлять переход к любому из имеющихся в базе видов.

Окно «Поражаемые породы» представлено альтернативной системой ручного поиска, осуществляемого по списку пород древесных растений, поражаемых перечисленными в соседнем окне грибами. Данный раздел также осуществляет переход к любому из патогенных видов, имеющихся в хранилище.

Форма программной среды также включает функцию автоматического поиска по генетической структуре возбудителей.

В качестве объектов, применяемых для видовой диагностики грибов, могут использоваться локусы ядерной (в частности, рибосомальной) и митохондриальной ДНК. В базу были включены три грибных видоспецифических ДНК-локуса: фрагмент рДНК, содержащий внутренние транскрибируемые спейсеры 1, 2 (BTC1 и BTC2) и ген 5.8S рРНК; фрагменты генов, детерминирующих полипептидные цепи  $\beta$ -тубулина и фактора элонгации трансляции.

Внутренние транскрибируемые спейсеры (BTC) представляют собой интронные (некодирующие) участки, разделяющие гены рибосомальной РНК транскрипционной единицы рибосомной ДНК. Ген  $\beta$ -тубулина ( $\beta$ -tub) детерминирует  $\beta$ -форму белка тубулина, входящего в структуру цитоскелета клетки. Ген eEF-1 $\alpha$  детерминирует субъединицу альфа фактора элонгации 1 – белок, взаимодействующий с рибосомами и обеспечивающий процесс элонгации трансляции. Эти участки характеризуются более высоким полиморфизмом по сравнению с генами рРНК, в связи с чем используются в качестве генетических маркеров [8].

Основными критериями выбора данных маркеров явились: мультикопийность (обеспечивает высокую диагностическую способность ПЦР-анализа, т. е. вероятность выявления патогена при его низкой концентрации в ткани); консервативность внутри вида; широкая изученность данных локусов и представленность информации об их нуклеотидной структуре в генетических базах данных и литературе. В случае рибосомальных локусов ядерной ДНК их мультикопийность связана с многократной tandemной повторностью данных регионов в хромосомах, в случае митохондриальных локусов – многочисленностью митохондрий в клетке и молекул мтДНК в каждой органелле. Отобранный набор ДНК-маркеров широко используется для изучения дивергенции и филогенетического родства видов [9].

Доступна функция поиска по количественному составу (размерам), перечисленных выше регионов ДНК грибов. Для этого в графе поиска указывается числовой диапазон в парах нуклеотидов,

который определяется по результатам электрофоретического анализа, а также аббревиатура исследуемого локуса: ITS, TUB, EF.

Например, при изучении спейсерных видоспецифических участков грибов (ВТС) исследователь выявляет виды, размер исследуемого локуса которых на электрофореграмме варьирует от 500–550 пар нуклеотидов. Для выяснения диапазона видов, отвечающих данным требованиям, в графе «Поиск» необходимо внести данные следующего характера: «500–550ITS». По результатам автоматического анализа программа выдаст список видов, согласно параметрам запроса.

Описанные выше типы поиска позволяют проводить идентификацию видов на основе внесенных в программу базы данных генотипов в автономном режиме, не обращаясь при этом к серверу банка генов NCBI в режиме он-лайн.

Из описанного выше основного раздела осуществляется переход к информационной форме «Виды патогенных грибов», элементы которой обеспечивают доступ к хранилищу данных. Указанная форма состоит из двух подразделов «Биологическая характеристика» и «Молекулярно-генетическая идентификация».

Подраздел «Биологическая характеристика» предназначен для хранения информации по биологии вида. Содержит информацию о таксономическом положении возбудителей, их морфологических особенностях и вызываемых ими болезнях. Здесь также представлены фотографии пораженных растений с симптомами болезней, внешний вид чистых культур грибов на определенной питательной среде, а также данные электронной микроскопии.

Подраздел «Молекулярно-генетическая идентификация» содержит информацию о генетических паспортах, составленных с использованием современных молекулярно-генетических методов: секвенирующего анализа, рестрикционного анализа, фрагментного анализа. Также указываются видоспецифические праймеры, используемые для проведения видовой диагностики. Подраздел осуществляет доступ к данным, полученным с использованием вышеперечисленных методов ДНК-анализа по трем видоспецифическим ДНК-локусам грибов: ITS,  $\beta$ -tub, EF. Данные по этим локусам представляют собой генетические паспорта для каждого вида в базе и служат в качестве определителя при проведении диагностики и идентификации возбудителей заболеваний. Созданная информационная база является открытой системой с функцией внесения новой информации и редактирования уже существующей. Для этого служит отдельный раздел «Ре-

дактор базы», переход к которому выполняется из основного меню программы.

**Заключение.** Внедрение методов молекулярно-генетического анализа в области лесной фитопатологии требует использования современных информационных технологий.

Разработанная автоматизированная система может быть эффективно применена для информационного сопровождения при проведении молекулярно-фитопатологического анализа. Она позволяет использовать большой объем информации о генетических особенностях и методах идентификации различных видов фитопатогенных микромицетов. Библиотека базы предоставляет возможность хранить нуклеотидные последовательности видоспецифических локусов фитопатогенных грибов, протоколы идентификации различными типами ДНК-маркеров, оперативно обновлять и обрабатывать накопленную информацию. Кроме того, можно проводить видовую идентификацию на основании имеющихся результатов молекулярно-генетического анализа.

### Литература

1. The Cocrane Library [Electronic resource]. URL: <http://www3.interscience.wiley.com/cgi-bin/mrwhome/106568753/HOME> (date of access: 20.01.2014).
2. EBSCO: Medical trial [Electronic resource]. URL: <http://trial.epnet.com> (date of access: 20.01.2014).
3. Health InterNetwork Access to Research Initiative [Electronic resource]. URL: <http://www.healthinternetwork.org> (date of access: 20.01.2014).
4. National Center for Biotechnological Information, NCBI [Electronic resource]. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> (date of access: 20.01.2014).
5. Celera GenBank [Electronic resource]. URL: <https://www.celera.com> (date of access: 20.01.2014).
6. Ensemble Genome Browser [Electronic resource]. URL: [www.ensembl.org](http://www.ensembl.org) (date of access: 20.01.2014).
7. UCSC Genome [Electronic resource]. URL: <https://genome.ucsc.edu> (date of access: 20.01.2014).
8. White T. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for // PCR protocols: a guide to methods and applications. 1990. P. 315–322.
9. Highlights of the *Didymellaceae*: A polyphasic approach to characterise *Phoma* and related pleosporalean genera / M. M. Aveskamp [et al.] // *Studies in Mycology*. 2010. Vol. 65. P. 1–60.

Поступила 05.02.2014