

**РАЗРАБОТКА НАБОРА МАРКЕРОВ  
ЕЛИ ЕВРОПЕЙСКОЙ, АССОЦИИРОВАННЫХ С БИОСИНТЕЗОМ  
ЛЕЙКОАНТОЦИАНИДИНА – БИОХИМИЧЕСКОГО ФАКТОРА,  
ОПРЕДЕЛЯЮЩЕГО УСТОЙЧИВОСТЬ К ЕЛОВОЙ КОРНЕВОЙ  
ГУБКЕ**

**Нестюк А.М.<sup>1</sup>, Пантелеев С.В.<sup>2</sup>, Кирьянов П.С.<sup>2</sup>, Баранов О.Ю.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Белорусский государственный технологический университет, г. Минск, Беларусь  
e-mail:antonina19nl.nestyuk@gmail;

<sup>2</sup>Институт леса НАН Беларуси, г. Гомель, Беларусь  
e-mail:betula-belarus@mail.ru

Объектом молекулярно-генетических исследований являются гены ели европейской, детерминирующие процессы биосинтеза лейкоантоцианидина. В ходе проведенного исследования разработан набор ДНК-маркеров для диагностики полиморфизма и уровня транскрипционной активности генов ели европейской, ассоциированных с биосинтезом флавоноидов и, в частности, лейкоантоцианидина, а также набор праймеров для ПЦР-амплификации.

Ель европейская (*Picea abies* (L.) Н. Karst.) – одна из главных лесообразующих пород, имеющая важное значение для лесной промышленности Беларуси. Среди фитопатогенов, повреждающих еловые насаждения, широкое распространение получила еловая корневая губка (*Heterobasidion parviporum* Niemelä&Korhonen) – базидиомицетный гриб, вызывающий пеструю ямчато-волокистую комлевую гниль. Помимо прямого вредного воздействия, выражающегося в виде ослабления и усыхания деревьев, снижения выхода деловой древесины, еловая корневая губка оказывает еще и косвенное негативное влияние, повышая угрозу формирования очагов массового размножения стволовых вредителей в ослабленных насаждениях. Перспективным направлением повышения биологической устойчивости еловых насаждений от повреждения корневой губкой является использование резистентных по отношению к *H. parviporum* генотипов *P. abies*. Согласно литературным данным, биохимической особенностью деревьев с повышенной устойчивостью к еловой корневой губке является накопление в древесине флавоноида – лейкоантоцианидина. Проведенные молекулярно-генетические исследования популяций ели европейской в Швеции показали, что уровень накопления лейкоантоцианидина в древесине ассоциирован с активностью гена PaLAR3, детерминирующего заключительный этап его биосинтеза [1]. В ходе изучения промотора локуса PaLAR3 у белорусских генотипов ели европейской, нами были идентифицированы новые аллельные варианты, относящиеся к группе «устойчивых», что, по всей видимости, может указывать на наличие более широкого спектра изменчивости, потенциально способной оказывать влияние на интенсивность биосинтеза лейкоантоцианидина [2, 3].

Исходя из всего вышесказанного, целью данного исследования явилась разработка набора EST-маркеров, позволяющего проводить оценку экспрессионной активности и полиморфизма генов, детерминирующих ключевые этапы биосинтеза лейкоантоцианидина – биохимического фактора, определяющего устойчивость *P. abies* к еловой корневой губке.

Объектом молекулярно-генетических исследований являлись гены биосинтеза лейкоантоцианидина у различных клонов плюсовых деревьев ели европейской.

Экспериментальный материал для исследований (фрагмент хвои длиной 5-7 мм) был собран со 150 рамет 50 клонов ели европейской, произрастающих в селекционных объектах, расположенных на территории ГЛХУ «Двинская экспериментальная лесная база Института леса НАН Беларуси». Получение препаратов суммарной ДНК и кДНК, амплификация и секвенирование диагностических локусов осуществлялось с применением коммерческих наборов [4]. В ходе предварительной работы, для амплификации полноразмерных кодирующих регионов генов (применительно к препаратам кДНК), были использованы олигонуклеотидные праймеры, комплементарные к консервативным участкам транскриптов *Picea* spp., представленных в международной базе данных NCBI GenBank [5]. Картирование экзонов проводилось на последовательности *Picea* spp., задепонированных в разделе WGS базы данных NCBI GenBank[5].

Несмотря на то, что перечень ключевых семейств генов, детерминирующих основные направления биосинтеза флавоноидов у ели европейской, был представлен 12 наименованиями: фенилаланин-аммиак-лиаза (*pal*), 4-гидроксилаза коричной кислоты (*4ch*), 4-кумарат-КоА лигаза (*4cl*), халкон-синтаза (*chs*), халконизомераза (*cli*), флаванон-3-гидроксилаза (*f3h*), дигидрофлавонол-редуктаза (*dfr*), лейкоантоцианидин-оксигеназа (*ldox*), флавонол-3-О-гликозид глюкозилтрансфераза (*ufgt*), флавонолсинтаза (*fvs*), лейкоантоцианидин-редуктаза (*lar*), антоцианидин-редуктаза (*anr*), для последующего анализа были отобраны восемь: *anr*, *cli*, *fvs*, *f3h*, *dfr*, *lar*, *ldox*, *chs*. Гены *pal*, *4ch*, *4cl* были исключены из дальнейших исследований, поскольку они детерминируют метаболические пути и других процессов, и не являются соответственно специфическими. Также был исключен и ген, кодирующий флавонол-3-О-гликозид глюкозилтрансферазу (UFGT), что связано с отсутствием значительных функциональных различий между его метаболизируемыми соединениями – антоцианидином и антоцианином, и, как следствие, низкой ролью в формировании специфических свойств у хемотипов ели европейской по признаку устойчивости.

Проведенное секвенирование транскриптов восьми генов *P. abies*: *anr*, *cli*, *fvs*, *f3h*, *dfr*, *lar*, *ldox*, *chs*, позволило получить данные о первичной структуре их кодирующих регионов. На основании использования онлайн сервиса поиска консервативных доменов (CD-search) базы данных NCBI, был проведен анализ структурно-функциональной организациитранскриптов с

целью определения локализации консервативных и переменных регионов в изучаемых экспрессируемых локусах ели европейской. На основании полученных данных были подобраны полиморфные области, фланкированные консервативными полинуклеотидными участками.

Разработка дизайна праймеров осуществлялась с помощью онлайн сервиса Primer-BLAST на основании следующих критериев [6]: температура плавления праймеров ( $T_m$ ) – 58-60 °С, диапазон различий в температурах плавления праймеров – 0-2 °С; GC-состав праймеров– 30,0-80,0%, максимальное количество GC'-нуклеотидов на 3'-конце праймера – 2, длина праймера– 18-30 н.о., наибольшее количество G-повторов – 3, максимально допустимое сходство с некоплементарными последовательностями – 12, максимально допустимое сходство с эктопическими сайтами в последовательности-мишени – 12, максимально допустимая сумма сходства пары праймеров (по одному для каждого праймера) с некоплементарными последовательностями – 24, максимально допустимое суммированное сходство обоих праймеров с эктопическими сайтами в последовательности-мишени – 24.

Разработанный дизайн праймеров для ПЦР-амплификации EST-маркеров, ассоциированных с выработкой флавоноидов у ели европейской, представлен в таблице. Тестирование разработанного набора праймеров показало, что ПЦР-продукты содержат одиночные зоны амплификации, тем самым указывая на высокую специфичность олигонуклеотидов. Коэффициент амплификации для разных пар варьировал в пределах 1,88-1,92, что является допустимым для использования данных маркеров при оценке транскрипционной активности генов методом ПЦР-РВ.

Таблица. Набор праймеров для ПЦР-амплификации EST-маркеров ели европейской, ассоциированных с биосинтезом флавоноидов

Локус	Нуклеотидная Структура праймера, F	Нуклеотидная структура праймера, R	Размер амплифици- руемого фрагмента, п.н.
1	2	3	4
ANR	CAACATGAAAGACGCCGTGG	TCCATGGCCGCAAAGATGAA	295
CLI	CAACGACCTTCAGGACTGGG	TGATGCCATTGCGGTCAGAT	296
FVS	TGCCATCGAAAACCACCAGA	TGACTGCCAAGTACGTTCCC	219
F3H	CCTACTGTAATCGCGCTGGT	TCTCTGGTATCGAAGGGGCA	302
DFR	TTTGGATGCCACCACATTGC	CGGAAGTTATCACTGCCCCT	331
LAR	GACATTGTGCCACGAAACCC	GCGACCATTTCCTTGACCTGA	359
LDOX	GGCCGGACTGAAATGTGAGA	TAACCCGTGGCTCCAATCAC	383
CHS	CCGATCCCATCCCTCAAGTG	CGCTCTCAGCTTCTTCGGAT	302
prLAR	AGGAAGGCAAAATAGGACTG	TTTTTGGCGGTTTGTTTTA	315 (A), 254 (B)

Таким образом, в результате проведенных исследований для *Picea abies* был разработан набор маркеров (и соответствующих им праймеров) для молекулярно-генетической диагностики полиморфизма и уровня активности генов биосинтеза лейкоантоцианидина. Диагностический набор маркеров может быть использован для идентификации и отбора деревьев ели европейской с повышенной устойчивостью к *Heterobasidion parviporum* с целью их последующего использования в селекционных и лесовосстановительных программах.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. *Nemesio-Gorriz M. et al.* Different alleles of a gene encoding leucoanthocyanidin reductase (PaLAR3) influence resistance against the fungus *Heterobasidion parviporum* in *Picea abies* // *Plant Physiology*. 2016. Vol. 171. №4. P. 2671-2681.
2. *Кирьянов П.С., Можаровская Л.В.* Разработка новых подходов к диагностике изменчивости промотора гена *PaLAR* ели европейской, ассоциированного с устойчивостью к *Heterobasidion parviporum* // *Современные проблемы лесозащиты и пути их решения : материалы II междунар. науч.-практ. конф., посвящ. 95-летию со дня рождения проф. Николая Ильича Федорова и 90-летию каф. лесозащиты и древесиноведения, Минск, 30 ноября – 4 декабря 2020 г. Минск : БГТУ, 2020. С. 122-125.*
3. *Нестюк А.М., Кирьянов П.С., Падутов А.В., Баранов О.Ю. и др.* Молекулярно-генетическая оценка устойчивости клонов плюсовых деревьев ели европейской к еловой корневой губке // *Лесное хозяйство : материалы 85-й науч.-техн. конференции профессорско-преподавательского состава, научных сотрудников и аспирантов (с международным участием), Минск, 1–13 февраля 2021 г. Минск: БГТУ, 2021. С. 139-141.*
4. Разработать молекулярно-генетическую тест-систему для проведения паспортизации и отбора хемотипов ели европейской с заданными свойствами древесины: отчет о НИР (заключ.) / Институт леса НАН Беларуси; рук. *В.Е. Падутов*; исполн.: *О.Ю. Баранов [и др.]*. Гомель, 2020. 178 с. Библиогр.: с. 75–88. Рег. № 20192434.
5. NCBI GeneBank [Electronic resource]. Mode of access: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/> Date of access: 03.05.2021.
6. Primer-BLAST [Electronic resource]. Mode of access: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/> Date of access: 03.05.2021.