

технологии Ion Torrent (Thermo Fisher Scientific, США).

В ходе аннотации результатов секвенирования транскриптомов, исследуемых проростков сосны обыкновенной, в базе данных GeneBank NCBI среди 150 кодирующих последовательностей, характеризующихся наибольшим уровнем экспрессии, был выявлен обширный спектр EST-локусов, детерминирующих структурные и функциональные полипептиды (SS/AF, AMP, DEF, GH19, LEA, DHN, CBP, PSACRE, HSP70, HSP90, HSP40S, белки PR-4 и PR-10, тауматин и противогрибковые тауматин-подобные белки, лейцин-насыщенные рецепторподобные протеинкиназы, глицин-насыщенные РНК-связывающие белки), вовлеченные в механизмы защиты растений. На основе полученных данных разработан набор из 15 маркеров и сформирован комплект праймеров для диагностики устойчивых генотипов сосны обыкновенной к инфекционному полеганию.

УДК 631.523.5

С. В. Пантелеев, ст. науч. сотр., канд. биол. наук;  
Л. В. Можаровская, науч. сотр.;  
О. Ю. Баранов, доц., д-р. биол. наук;  
(ГНУ «Институт леса НАН Беларуси, г. Гомель»)

### **ИЗУЧЕНИЕ СТРУКТУРНЫХ ОСОБЕННОСТЕЙ COI-ГАПЛОТИПОВ ВЕРШИННОГО КОРОЕДА (*IPS ACUMINATUS* GYLL.) НА ЮГЕ БЕЛАРУСИ**

В связи с изменяющейся экологической ситуацией в ряде стран мира (США, Германия, Италия, Словакия, Чехия, Польша, Латвия, Беларусь и др.) наблюдается значительное ослабление лесных насаждений, что приводит к развитию массовых очагов болезней и вредителей, ранее являющихся естественным фоном в лесных биоценозах. При этом, несмотря на продолжительность исследований по проблеме усыхания лесных насаждений в разных странах мира, методы ранней диагностики формирующихся очагов отсутствуют, а данные о популяционных механизмах их формирования изучены в недостаточной степени.

Целью данного исследования являлось изучение особенностей нуклеотидной структуры гаплотипических вариантов гена *mtCOI* вершинного короеда (*Ips acuminatus* Gyll.) в южных белорусских популяциях для последующего использования полученных данных в ходе популяционно-генетических исследований очагов вредителя. Экспериментальный материал (имаго *I. acuminatus*) был собран в очагах короедного усыхания сосны на территории двух лесхозов: ГОЛХУ «Го-

мельский опытный лесхоз» (25 особей) и ГСЛХУ «Чечерский спецлесхоз» (24 особи). Изучение генетического полиморфизма  $mtCOI$  вершинного короёда осуществлялось с помощью двух подходов: сопоставление результатов секвенирования ампликонов по методу Сэнгера (на базе генетического анализатора Applied Biosystems® 3500) и выравнивание последовательностей из данных, полученных в ходе высокопроизводительного секвенирования митохондриальных геномов (с применением геномного анализатора Ion PGM System (Thermo Scientific, США)). Анализ полученных данных проводился в программном обеспечении Sequencing Analysis 5.1.1, IonTorrent Suite v. 4.0, SnapGene 3.2.1, CLC sequence Viewer 8.0, MEGA7, онлайн-сервисах NCBI Primer-BLAST и MITOS Web Server.

В качестве маркерного региона был выбран фрагмент (координаты нуклеотидных позиций 1-689) гена субъединицы 1 цитохром с-оксидазы (COI), широко используемый при проведении популяционных исследованиях различных видов насекомых [1]. Предварительный анализ митохондриального генома суммарного образца индивидов, собранных на территории ГОЛХУ «Гомельский опытный лесхоз», выявил в пределах региона гена  $mtCOI$  наличие широкого спектра внутривидового полиморфизма, связанного с различными вариантами нуклеотидных замещений. Кроме того, нуклеотидные последовательности  $mtCOI$ , относящиеся к области отжига праймеров, характеризовались отсутствием полной комплементарности к олигонуклеотидам, используемым в унифицированном протоколе ПЦР-анализа различных групп насекомых [1]. Таким образом, полученные результаты анализа митохондриального генома вершинного короёда показали, что изученный регион локуса  $mtCOI$  представляет собой информативный маркер для проведения популяционных исследований *I. acuminatus*. В то же время, ПЦР-диагностика данного маркера, требует разработки нового дизайна олигонуклеотидных праймеров для проведения его амплификации. Консенсусная последовательность митохондриального генома вершинного короёда была депонирована в международной базе генетических данных GenBank NCBI, с присвоением регистрационного номера MK988441.

С целью унификации разрабатываемого маркера  $mtCOI$  вершинного короёда применительно к результатам исследований, представленным в литературе, и его интеграцией в международную базу данных ДНК-штрихкодирования Insecta, в ходе разработки новых праймеров, было проведено внесение в их последовательности видоспецифических для вершинного короёда нуклеотидных позиций, наряду с сохранением всех термодинамических параметров олигонуклеотидов.

Апробация сконструированных праймеров с учетом выявленного полиморфизма гена COI (НСО-АСУМ 5'-ТАААСТТСТGGATGTССАА

AAAATCA-3' LCO-ACUM, 5'-TCTCCASTAACCACAAGGATATTGG-3') показала успешную амплификацию во всех исследованных образцах (коэффициент эффективности ПЦР составил 1,92). Последующее изучение гаплотипических вариантов осуществлялось посредством секвенирования ампликонов *mtCOI* отдельных индивидов вершинного короеда, последующим выравниванием последовательностей и детекцией SNP.

В результате сопоставления нуклеотидных последовательностей гена *COI* в исследованной выборке *I. acuminatus* и последующего анализа филогенетических дендрограмм с использованием методов невзвешенного попарного среднего (UPGMA) и ближайшего присоединения соседей (NJ) было выявлено 14 вариантов гаплотипов. Следует отметить, что особенностью исследованной выборки *I. acuminatus* явилось наличие значительного числа (67%) особей, содержащих в геноме не менее двух *COI*-гаплотипов одновременно.

Изучение уровня генетической дифференциации между гаплотипами с использованием моделей Джукса-Кантора (JC) и Кимуры (K80) выявило широкий диапазон варьирования значений показателя *D* – от 0,001 до 0,064, что соответствовало 1-45 мутаций на исследуемый регион, составляя в среднем  $\approx 6,4$  SNP на 100 н.о. Выявленные SNP были представлены транзициями и трансверсиями, которые в 18% случаев приводили к замене аминокислоты в полипептидной цепи (миссенс-мутации). Точечные замены в кодонах отмечались в 70% случаев в 3-й позиции, 20% – 1-й позиции, 10% – 2-й позиции, что соответствовало литературным данным [2]. Последующее 3D-моделирование структуры белковых молекул на базе онлайн-сервиса Molbiol-Tools [3] с использованием модели SWISS-MODEL позволило изучить конформацию полипептидной цепи цитохром с-оксидазы с учетом выявленного полиморфизма. Согласно построенной карте Рамачандрана во всех случаях значения торсионных углов располагались в четырех координатных плоскостях, но скученно отмечались преимущественно в третьей четверти, что свидетельствовало об отрицательном значении углов  $\phi$  и  $\psi$  для альфа-спиралей. Для остатков глицина и пролина картина оставалась сходной с общей. Таким образом, существенные отклонения в торсионных углах, влияющие на конформацию полипептидных цепей цитохром с-оксидазы исследуемых *COI*-гаплотипов, не выявлены. Анализ пептидных последовательностей *COI*-гаплотипов в базе данных CDART NCBI также показал, что, несмотря на имеющийся полиморфизм, доменная архитектура белка остается неизменной.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Folmer O., Black M., Hoeh W., Lutz R., Vrijenhoek R. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I

from diverse metazoan invertebrates // *Molecular Marine Biology and Biotechnology*. 1994. Vol. 3, no 5. P. 294-299.

2. Castle J. C. SNPs occur in regions with less genomic sequence conservation // *PLoS One*. 2011. Vol. 6. e20660.

3. Online Analysis Tools – Protein tertiary structure. URL: [https://molbiol-tools.ca/Protein\\_tertiary\\_structure.htm](https://molbiol-tools.ca/Protein_tertiary_structure.htm) (дата обращения 24.01.2020).

УДК 632.651

А. Ю. Рысс, вед. науч. сотр. (Зоологический институт РАН);

Л. О. Иващенко, стажер, мл. науч. сотр.;

В. Б. Звягинцев, зав. кафедрой, канд. биол. наук (БГТУ, г. Минск)

### **АКТИВНОСТЬ РАЗМНОЖЕНИЯ ФИТОПАТОГЕННЫХ НЕМАТОД РОДА *BURSAPHELENCHUS* В ТКАНЯХ МЕСТНЫХ И ИНТРОДУЦИРОВАННЫХ ДРЕВЕСНЫХ ПОРОД**

В ходе исследования ясеневых насаждений *Fraxinus excelsior* L. в 2017–2018 гг. был выявлен новый для Беларуси вид нематоды *Bursaphelenchus crenati* Rühm, 1956. В литературе данный вид рассматривается как вредитель, связанный с массовым усыханием ясеня в Европе. Переносчиком бурсафеленха является большой ясеневый лубоед *Hylesinus crenatus* Fabricius, 1767. Ясень, пораженный халаровым некрозом и заселенный большим ясеневым лубоедом, представляет собой идеальную кормовую базу для данного вида нематод.

Целью работы было определить видоспецифичность фитопаразитических нематод рода *Bursaphelenchus* по отношению к местным (*Fraxinus excelsior*, *Betula pendula*, *Alnus glutinosa*, *Populus tremula*, *Picea abies*) и интродуцированным (*Fraxinus pennsylvanica*, *Fraxinus mandshurica*, *Fraxinus americana*, *Fraxinus rynchophylla*, *Fraxinus ornus*, *Ulmus minor*) видам растений.

В ходе эксперимента нами была определена видоспецифичность 2 видов нематод: *Bursaphelenchus crenati* (белорусская популяция) и *Bursaphelenchus sp.* (дальневосточная популяция) на 11 видах древесных растений по методу А. Ю. Рысса (2017 г.).

В результате проведенного эксперимента нами было выявлено, что наиболее чувствительным к поражению нематодой *Bursaphelenchus crenati* является *Fraxinus ornus*, а к дальневосточной – *Picea abies*. Однако в связи с низкой финальной численностью нематод и большим разбросом полученных данных невозможно четко установить видоспецифичность нематод. Необходимо проведение дальнейших исследований вопроса патогенности белорусской популяции *Bursaphelenchus crenati* и ее роли в массовом усыхании ясеня.