

(≈ 3 USD) по сравнению с алгоритмами, использующими технологию секвенирования. Достоверность получаемых результатов видовой идентификации выше по сравнению с методами, основанными на применении видоспецифических праймеров, вследствие отсутствия кросс-амплификации. Данный метод диагностики может быть применим при работе с различными типами образцов насекомых, включая и энтомологические коллекции. При этом в ходе анализа имеется возможность диагностики как отдельных видов патогенов, так и их сообществ.

Работа была частично поддержана грантом БРФФИ Б20Р-175

Литература

1. C. L. Schocha, K. A. Seifertb, S. Huhndorf [et al.] Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi // PNAS - 2012 - V. 109, №16 – P. 6241–6246.
2. Arteau, M., Labrie, S., Roy, D., 2010. Terminal-restriction fragment length polymorphism and automated ribosomal intergenic spacer analysis profiling of fungal communities in Camembert cheese. Int. Dairy J. 20 (8), 545-554.
3. Callon, C., Delbès, C., Duthoit, F., Montel, M.C., 2006. Application of SSCP-PCR fingerprinting to profile the yeast community in raw milk Salers cheeses. Syst. Appl. Microbiol. 29 (2), 172-180.
4. Gori, K., Ryssel, M., Arneborg, N., Jespersen, L., 2013. Isolation and identification of the microbiota of Danish farmhouse and industrially produced surface-ripened cheeses. Microb. Ecol. 65 (3), 602-615.

ОЦЕНКА ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ ШЕСТИЗУБЧАТОГО КОРОЕДА НА ТЕРРИТОРИИ БЕЛАРУСИ

Пантелейев С.В., Разумова О.А., Баранов О.Ю.

Институт леса НАН Беларуси, e-mail stasikdesu@mail.ru

ASSESSMENT OF GENETIC DIVERSITY OF THE SIX-TOOTHED BARK BEETLE IN THE TERRITORY OF BELARUS

Panteleev S.V., Razumova O.A., Baranov O.Yu.

Molecular genetic research of Belarusian populations of the six-toothed bark beetle were carried out. 53 variants of genotypes were identified for the mtCOI marker locus. In the studied geographic regions

(Gomel, Minsk and Brest) only one haplotype significantly dominated (47.6% of individuals). The revealed population structure with a decrease in intraspecific diversity is most likely due to factors including the founder and the bottleneck effects, the effective population size and flight capacity of individuals.

Шестизубый короед (*Ips sexdentatus* Boerner.) – один из широко распространенных видов сколитид в странах Центральной и Южной Европы. Заселяет вредитель в основном сосны, но при вспышках численности может поражать также ель и лиственницу [1]. Несмотря на широкое распространение вида, его филогеография с использованием генетических маркеров интенсивно изучается лишь в последние несколько лет [2].

С целью изучения генетического разнообразия вида в Беларуси сбор экспериментального материала (имаго *I. sexdentatus*) осуществлялся в сосновых насаждениях Гомельской, Минской и Брестской областей на территории семи государственных лесохозяйственных учреждений: ГЛХУ «Кореневская экспериментальная лесная база Института леса НАН Беларуси», Ченковское лесничество (кв. 225, выд. 10); Зябровское лесничество (кв. 419, выд. 3) – 24 особи. ГСЛХУ «Чечерский спецлесхоз», Чечерское лесничество (кв. 53, выд. 21) – 22 особи. ГЛХУ «Лельчицкий лесхоз», Жмунянское лесничество (кв. 49, выд. 9) – 24 особи.

ГОЛХУ «Вилейский опытный лесхоз», Вязынское лесничество (кв. 5, выд. 1; кв. 101, выд. 4) – 24 особи. ГЛХУ «Столбцовский лесхоз», Опечковское лесничество (кв. 61, выд. 16) – 24 особи. ГЛХУ «Телеханский лесхоз», Калининское лесничество (кв. 32, выд. 23; кв. 56, выд. 37) – 24 особи. ГЛХУ «Лунинецкий лесхоз», Синкевичское лесничество (кв., 52, выд. 46; кв. 14, выд. 52; кв. 54, выд. 97) – 22 особи. Итого было исследовано 164 особи имаго.

Получение препаратов ДНК осуществлялось согласно протоколу СТАВ-метода [3]. В качестве генетического маркера для популяционных исследований был выбран фрагмент гена субъединицы I митохондриальной цитохром с-оксидазы ($mtcoI$), ПЦР-амплификация которого осуществлялась с использованием праймеров LCO-SEXDEN 5'-ATTCAACAAACCACAAAGACATCGG-3' и HCO-ACUM 5'-TAAAC-TTCTGGATGTCCA AAAAATCA-3', разработанных нами на основании данных геномного секвенирования митохондриальной ДНК *I. sexdentatus*, доступных в базе генетического банка NCBI [4]. Секвенирование маркерного локуса проводилось на базе генетического анализатора Applied Biosystems® 3500 (Thermo Scientific, США) согласно

протоколу, рекомендованному изготавителем. Анализ полученных данных осуществлялся при помощи программного обеспечения Sequencing Analysis 5.1.1, CLC sequenc Viewer 8.0, DnaSP 6 и онлайн-сервисов NCBI BLAST и BOLD [4, 5].

В ходе работы для каждой исследуемой особи шестизубчатого короеда (164 шт.) был секвенирован фрагмент гена *mtCOI*, насчитывающий 677 нуклеотидных оснований (н.о.). Сравнительный генетический анализ по данному локусу, включающий построение дендрограмм методом ближайшего присоединения соседей (NJ) с использованием двухпараметрической модели Кимуры [6] и бутстрэп-анализа (100 повторов), позволил идентифицировать 53 варианта генотипов, три из которых ($\approx 6\%$) содержали в геноме не менее двух mtCOI-гаплотипов (гетероплазмия). Выявленные генотипы отсутствовали в базе данных NCBI GenBank. Анализ нуклеотидных последовательностей в базе данных BOLD показал, что один из гаплотипов (MT313186) генотипирован в недавнем времени также в Норвегии (ID: NOCOL1796) из энтомологических коллекций *I. sexdentatus* 2008 г. В остальных случаях генетическая идентичность сравниваемых образцов с европейскими депозитами NCBI и BOLD варьировала в диапазоне 98–99%.

За исключением одного сиквенса (по причине вероятной амплификации помимо гена *mtCOI* также псевдогена ядерной ДНК – NUMT) идентифицированные генотипы были депонированы в базу данных NCBI GenBank с присвоением идентификационных номеров: MT920089-MT920107, MT313186-MT313194, MT936905-MT936928.

Детальный анализ при сопоставлении полученных нуклеотидных последовательностей показал, что количество нуклеотидных замен на исследуемый регион (677 н.о.) составляло от одного до шести нуклеотидов (показатель эволюционной дистанции $D = 0,001$ - $0,008$). Мутации были представлены в основном ($\approx 80\%$) транзициями и реже трансверсиями в 3-й позиции кодона, и оказались синонимичными. При этом единичные замены в 1-й и 2-й позициях кодона у четырех гаплотипов (MT313190, MT936906, MT936918, MT920100) привели к появлению в полипептидной цепи новой аминокислоты (позиции при трансляции: 96, 108, 127 и 141).

На рисунке 1 представлено распространение митохондриальных клад *I. sexdentatus* по маркерному локусу цитохром-с-оксидазы (субъединица I) на основании установленной встречаемости (%) гаплотипов в популяционной выборке. При построении денограмм учитывались только гаплотипы, встречающиеся в двух и более исследуемых локациях.