

тлю (*Eucallipterus tiliae*) и инвазивную каштановую минирующую моль (*Cameraria ohridella*).

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Горленко, С.В. Устойчивость древесных интродуцентов к биотическим факторам / С.В. Горленко, А.И. Блинцов, Н.А. Панько. – Минск : Наука и техника, 1988. – 189 с.
2. Беттхер, И. Методы определения болезней и вредителей сельскохозяйственных растений / И. Беттхер, Т. Ветцель, Ф.В. Древис. – М.: Агропромиздат, 1987. – 224с.
3. Гербарное дело : Справ. рук. / ред. Д. Бридсон, Л. Форман. – Кью: Королевский ботанический сад, 1995. – 341 с.

УДК 630\*165

Л.В. Можаровская, ст. науч. сотр., канд. биол. наук;  
А.В. Падутов, науч. сотр.;  
П.С. Кирьянов, мл. науч. сотр.  
(Институт леса НАН Беларуси, г. Гомель)

#### **АНАЛИЗ ПОЛИМОРФИЗМА ДНК-ЛОКУСОВ *MYB4* И *TUA PINUS SYLVESTRIS* L., АССОЦИИРОВАННЫХ С АНАТОМИЧЕСКИМИ ПРИЗНАКАМИ ДРЕВЕСИНЫ**

Одним из важных направлений лесного хозяйства является создание высокопродуктивных насаждений на генетико-селекционной основе. Эффективным путем решения данной задачи является поиск хозяйственно-ценных генотипов, базирующийся на оценке генетического разнообразия и анализе структурно-функциональной изменчивости признаков, с использованием инструментов молекулярно-генетического анализа.

Сосна обыкновенная (*Pinus sylvestris* L.) – главная лесообразующая порода Беларуси. Сосновые насаждения имеют важное хозяйственное значение, служат основным поставщиком древесины. Анатомические особенности древесины определяют её физико-химические параметры и представляют собой важный предмет для молекулярно-биологического исследования. Основным компонентом древесины являются клеточные стенки (составляют более 90% сухой массы растений), состав и структура которых обуславливают её свойства [1].

Биосинтез составных элементов вторичной клеточной стенки (лигнин, целлюлоза и гемицеллюлоза) регулируется не только структурными генами, но и многими транскрипционными факторами. В исследовании Яо Ш. с соавторами для сосны Массона (*Pinus massoniana* Lamb.) показано участие транскрипционного фактора *MYB4* в форми-

ровании вторичной клеточной стенки и биосинтезе лигнина [2]. На примере сосны ладанной (*Pinus taeda* L.) в литературе отмечена взаимосвязь организации микротрубочек, состоящих из  $\alpha$ -тубулина (TUA) и  $\beta$ -тубулина (TUB), с отложением микрофибрилл целлюлозы, играющих центральную роль в развитии вторичной клеточной стенки растений [3].

Исходя из выше сказанного, цель настоящей работы заключалась в анализе полиморфизма структуры ДНК-локусов *MYB4* и *TUA* сосны обыкновенной, как потенциальных ДНК-маркеров, ассоциированных с анатомическими признаками древесины.

Объектом исследований являлись плюсовые деревья ( $n = 15$ ) сосны обыкновенной, произрастающие в Ченковском лесничестве ГЛХУ «Кореневская экспериментальная лесная база Института леса НАН Беларуси». Препараты ДНК получали СТАВ-методом из фрагментов тканей камбиальных зон стволов деревьев, отобранных на высоте 1,2-1,3 м от поверхности земли [4]. Для ДНК-идентификации локусов *MYB4* и *TUA* использовались праймеры, разработанные ранее на основе представленных в NCBI GenBank нуклеотидных последовательностей близкородственных видов *P. massoniana* (депонент NCBI KM496535.1, ДНК-локус – *MYB4*) и *P. pinaster* (депонент NCBI EU482894.1, ДНК-локус – *TUA*). оследовательность праймеров для ДНК-локуса *MYB4*: F–5'- GGCCTCCACCAACAACAGTA -3', R–5'- GCATGGCTGATGATCCGTAGT -3' (размер локуса – 697 п.н.); *TUA* – F–5'- CTGCACGGGTCTTCAAGGAT -3', R–5'- CTTAATCGTTGCGACAGCGG -3' (размер локуса – 625 п.н.). ПЦР-анализ проводился на основании использования DreamTaq Green PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, США) при следующих параметрах реакции: начальная денатурация 3 мин. при температуре 95 °С, последующие 35 циклов: при 95 °С – 30 сек., при 55 °С (для *MYB4*) или 60 °С (для *TUA*) – 25 сек., при 72 °С – 45 сек., финальная элонгация 7 мин. при 72 °С.

В результате предварительного анализа продуктов амплификации с помощью электрофоретического фракционирования в 2 % агарозном геле с последующим окрашиванием бромистым этидием выявлены фракции: ~ 680 п.н. (*MYB4*), ~ 810 п.н. (*TUA*). Для оценки полиморфизма ДНК-локусов *MYB4* и *TUA* исследуемых образцов готовилась смесь ПЦР-ампликонов 15 генотипов с последующим секвенированием.

Секвенирующая реакция проводилась на основании использования набора BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific, США), детекцию меченых продуктов проводили в генетическом анализаторе 3500 Applied Biosystems (Thermo Fisher Scientific, США) в соответствии с протоколом фирмы-изготовителя.

Анализ полученных данных (расшифровка нуклеотидной структуры) генетического анализатора проводили на основе программного пакета Sequencing Analysis Software 5.1.1.

В ходе анализа хроматограммы секвенирования нуклеотидной структуры смеси ПЦР-ампликонов ДНК-локуса *MYB4* было выявлено множество полиморфных сайтов. Для установления характера полиморфизма, дополнительно проведено секвенирование ПЦР-ампликонов ДНК-локусов *MYB4* четырех генотипов деревьев сосны обыкновенной. В результате было установлено, что для каждого отдельно исследуемого генотипа ДНК-локус *MYB4* является высокополиморфным, что может свидетельствовать о наличии паралогов гена *MYB4*.

При изучении результатов секвенирования нуклеотидной структуры смеси ПЦР-ампликонов ДНК-локуса *TUA* идентифицирована мономорфная нуклеотидная последовательность размером 811 п.н. Сравнительное изучение нуклеотидной последовательности в базе данных NCBI для рода *Pinus* показало наибольшее сходство в 99,69 % (покрытие 78 %) с учетной записью KM496535.1, относящейся к мРНК *P. massoniana*. При этом ДНК-локус *TUA P. massoniana* является коротким (626 п.н.) с делецией в 185 п.н. (с 319 по 503 н.о. идентифицированной референсной последовательности *P. sylvestris*). Варианты ДНК-локуса *TUA* без делеций, сходные идентифицированной нами последовательности, в базе данных полногеномных проектов (WGS) NCBI отмечены для видов рода *Pinus*, как например, *P. taeda* с учетной записью APFE030736927.1 (сходство 98,28%, покрытие 100%)

Таким образом, проведен анализ нуклеотидной структуры ДНК-локусов *MYB4* и *TUA* исследуемых генотипов плюсовых деревьев сосны обыкновенной, установлено, что данные ДНК-локусы являются полиморфными как по нуклеотидной структуре, так и по размеру амплифицируемого фрагмента и могут быть использованы как ДНК-маркеры, ассоциированные с анатомическими признаками древесины.

*Исследование финансировано БРФФИ в рамках научного проекта № Б22М-020*

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Blanch H. W. Bioprocessing for biofuels // Current opinion in biotechnology. 2012. V. 23. № 3. P. 390-395.
2. Yao S. et al. *PmMYB4*, a Transcriptional activator from *Pinus massoniana*, regulates secondary cell wall formation and lignin biosynthesis // Forests. 2021. V. 12. № 12. P. 1618.
3. Gonzalez-Martinez S.C. et al. Association genetics in *Pinus taeda* LI Wood property traits // Genetics. 2007. V. 175. № 1. P. 399-409.
4. Падутов В. Е., Баранов О. Ю., Воропаев Е. В. Методы молекулярно-генетического анализа. 2007. 176 с.