

УДК 631.523.5

ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПОЛИМОРФИЗМ ЛОКУСА mtCOI ВЕРШИННОГО КОРОЕДА *Ips acuminatus* Gyll. В БЕЛОРУССКИХ ПОПУЛЯЦИЯХ

С. В. Пантелеев¹, Л. В. Можаровская¹, О. Ю. Баранов¹,
В. А. Ярмолович², В. Е. Падутов¹

¹ Институт леса Национальной академии наук Беларуси
Республика Беларусь, 246050, Гомель, ул. Пролетарская, 71

² Белорусский государственный технологический университет
Республика Беларусь, 220006, Минск, ул. Свердлова, 13а

E-mail: stasikdesu@mail.ru, milamozh@yandex.ru, betula-belarus@mail.ru,
yarm@belstu.by, forestgen@mail.ru

Поступила в редакцию 06.04.2020 г.

В ходе молекулярно-генетических исследований проведены секвенирование и аннотация митохондриального генома вершинного короеда *Ips acuminatus* Gyll., включая баркодинговый маркер насекомых – ген субъединицы I митохондриальной цитохром с-оксидазы (*mtCOI*). По результатам сравнительной оценки уровня полиморфизма среди генов мтДНК установлено, что *mtCOI* характеризуется средним уровнем изменчивости. Предварительное изучение белорусских популяций вершинного короеда позволило идентифицировать 18 гаплотипических вариантов по маркерному локусу mtCOI (фрагмент гена *mtCOI*). При этом значительная часть исследованных особей (50 %) характеризовалась наличием гетероплазмии – содержала в геноме не менее двух гаплотипов маркерного локуса одновременно. Изучение уровня генетической дифференциации между гаплотипами с использованием моделей Джукса–Кантора (JC) и Кимуры (K80) выявило широкий диапазон варьирования значений показателя эволюционной дистанции D – от 0.001 до 0.066, что соответствовало 1–46 нуклеотидным заменам на исследуемый регион (690 н. о.) у отдельных гаплотипов. Анализ транскрибируемых последовательностей mtCOI-локуса вершинного короеда с использованием технологии 3D-моделирования показал, что доменная архитектура белка – субъединицы I цитохром с-оксидазы остается для большинства (94 %) гаплотипов неизменной и функциональность аллоферментов не нарушается, что свидетельствует об относительно нейтральном характере выявляемой изменчивости. На основании полученных совокупных молекулярно-генетических данных сделан вывод, что степень информативности ДНК-маркера mtCOI является достаточной для проведения популяционно-генетических исследований вершинного короеда, включая оценку его миграционной активности.

Ключевые слова: митохондриальная ДНК, гаплотип, секвенирование.

DOI: 10.15372/SJFS20200403

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время в связи с изменяющейся экологической ситуацией в ряде стран мира (США, Германия, Италия, Словакия, Чехия, Польша, Латвия и др.), включая Республику Беларусь, наблюдается значительное ослабление лесных насаждений, что приводит к развитию массовых очагов болезней и вредителей, ра-

нее являвшихся естественным фоном в лесных биоценозах (Bentz et al., 2010; Colombari et al., 2013; Siitonen, 2014; Krivan et al., 2016; Сазонов, Звягинцев, 2016; Hlasny et al., 2019). Наиболее остро данная ситуация прослеживается в хвойных лесах на юге Беларуси по причине чрезмерного развития популяций ксилофагов, в первую очередь вершинного *Ips acuminatus* Gyll. и шестизубчатого *Ips sexdentatus* Voernер короедов.

Для повышения биологической устойчивости сосновых формаций необходима оптимизация современной системы лесозащиты, выражающаяся в направленном проведении мероприятий по контролю численности вредителей. Для реализации данной цели разработан «Алгоритм действий в усыхающих сосновых насаждениях Беларуси» (от 04.07.2017 № 251-17-08/856), регламентирующий порядок обследования сосняков, а также перечень необходимых санитарно-оздоровительных мероприятий.

При этом, несмотря на продолжительные исследования по проблеме короедного усыхания хвойных насаждений в разных странах мира, точность и информативность методов прогнозирования возникновения очагов вредителей до настоящего момента остаются низкими, что связано с недостаточной изученностью популяционных механизмов их формирования. В то же время современные методы молекулярно-генетического анализа позволяют решить задачи, ранее недоступные или трудновыполнимые, с использованием традиционных методов лесопатологического мониторинга и лесозащиты. Так, генетические исследования позволяют произвести оценку структуры популяций вредителей, установить направленность и интенсивность их миграционных процессов, выявить генетические закономерности при формировании очагов (Bark beetles..., 2015; Avtzis et al., 2019).

Ген субъединицы I митохондриальной цитохром с-оксидазы ($_{mt}coI$) является одним из наиболее распространенных ДНК-маркеров, используемых для проведения видовой идентификации животных организмов. Как правило, это связано с относительно высоким уровнем его мутабельности, что позволяет диагностировать различия даже между эволюционно близкими видами. Кроме того, для многих групп животных использование $_{mt}coI$ дает возможность проводить сравнительный анализ не только на межвидовом, но и на внутривидовом уровне (Ward et al., 2005; Meyer, Paulay, 2005; Meier et al., 2006; Clare et al., 2007; Kerr et al., 2007). При этом информативность маркера зачастую определяется не принадлежностью изучаемых видов к определенной таксономической группе, а зависит от их эволюционной истории и эколого-биологических особенностей (Pfeiler, Markow, 2017).

Цель данного исследования – изучение аллельного полиморфизма $mtCOI$ -маркера (фрагмента гена I субъединицы митохондриальной цитохром с-оксидазы) вершинного короеда для

определения его информативности применительно к популяционно-генетическим исследованиям очагов вредителя.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Экспериментальный материал (имаго вершинного короеда) собран в очагах короедного усыхания сосны *Pinus* L. на вырубках (ССР) двух лесхозов: ГОЛХУ «Гомельский опытный лесхоз» (выдел 2 квартала 405 и выдел 2 квартала 413 Добрушского лесничества (D) – 24 особи; выдел 20 квартала 179 Макеевского лесничества (M) – 31 особь), ГСЛХУ «Чечерский спецлесхоз» (выдел 10 квартала 22 Чечерского лесничества (Ch) – 24 особи).

Получение препаратов суммарной ДНК осуществлялось с использованием модифицированного СТАВ-метода.

Особи вершинного короеда по отдельности гомогенизировались в центрифужных пробирках типа «Eppendorf» объемом 1.5 мл, содержащих экстрагирующий буфер СТАВ объемом 600 мкл (Падутов и др., 2007). Дополнительно вносили β -меркаптоэтанол до конечной концентрации 0.2 %. Пробирки с растертыми тканями инкубировались в твердотельном термостате в течение 10 мин при $T = 65$ °С. Крупные остатки внешних покровов осаждались центрифугированием на протяжении 5 мин при 5000 об/мин.

Полученный супернатант очищали добавлением хлороформа в соотношении 1 : 1 и перемешивали на горизонтальном шейкере в течение 5 мин при комнатной температуре. Пробирки с хлороформом центрифугировались при 13 000 об/мин ($T = 18-20$ °С) в течение 10 мин. В отобранный супернатант (400 мкл) добавляли равный объем изопропилового спирта. Содержимое перемешивали путем переворачивания закрытых пробирок и оставляли на 10 мин при комнатной температуре. Далее образцы центрифугировали при 13 000 об/мин в течение 10 мин ($T = 18-20$ °С). Супернатант сливали, а полученный осадок ДНК промывали 1000 мкл 70 % этанола, охлажденного до -10 °С. Процедуру промывки повторяли дважды. Высушенный осадок ДНК растворяли в 100 мкл бидистиллированной воды и инкубировали в твердотельном термостате при температуре 45 °С в течение 10 мин.

Полученные препараты ДНК оценивали с помощью спектрофотометра NanoPhotometer P330 (Implen, Германия) (Glasel, 1995; Tataurov et al., 2008).

Изучение генетического полиморфизма мтДНК вершинного короёда осуществлялось с помощью двух подходов: анализа результатов секвенирования (методом Сэнгера) ампликонов фрагмента маркерного гена и обработки биоинформационных данных, полученных в ходе высокопроизводительного секвенирования (технология Ion Torrent) целостных митохондриальных геномов.

Для создания мтДНК-обогащенной ДНК-библиотеки вершинного короёда использован суммарный биологический образец из 25 имаго. Высокопроизводительное секвенирование выполнялось с использованием секвенатора Ion PGM Torrent (Thermo Scientific, США) в соответствии с инструкцией фирмы-производителя и протокола анализа для ДНК-библиотек размером 200 п. н.

Секвенирование гаплотипов по методу Сэнгера осуществлялось для каждой особи в отдельности. В качестве маркерного региона выбран фрагмент (координаты нуклеотидных позиций 1–690) гена субъединицы I цитохром с-оксидазы (*mtCOI*), широко используемый при проведении популяционных исследований различных видов насекомых (Folmer et al., 1994).

Полимеразная цепная реакция осуществлялась с применением наборов DreamTaq Green PCR Master Mix (2X) (ThermoFisher Scientific, США) и ArtMix Форез (2X) (АртБиоТех, РБ) согласно инструкции фирм-производителей. Термический ПЦР-профиль был следующим:

1-й этап (1 цикл): денатурация ($t = 3$ мин, $T = 95$ °C); 2-й этап (35 циклов): денатурация ($t = 30$ с, $T = 95$ °C); отжиг ($t = 20$ с, $T = 55$ °C); элонгация ($t = 45$ с, $T = 72$ °C); 3-й этап (1 цикл): охлаждение реакционной смеси ($t = 5$ мин, $T = 4$ °C).

Электрофоретическое разделение проводили в горизонтальных электрофоретических камерах, фракционирование продуктов ПЦР – в 1.5 % агарозном геле с использованием $1 \times$ TBE буфера в соответствии с инструкцией на используемое электрофоретическое оборудование. Электрофорез проводили при комнатной температуре в течение 45 мин при параметрах тока 6 Вт. Окраска гелей осуществлялась в растворе бромистого этидия (0.5 мкг/мл) в течение 5 мин. Визуализация продуктов ПЦР достигалась за счет просматривания окрашенных гелей в УФ-свете. Фракции ДНК при этом проявлялись в виде светлых полос на темном фоне.

Секвенирующую реакцию проводили в специальных полипропиленовых тонкостенных

пробирках объемом 200 мкл в соответствии с рекомендациями к набору BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit по следующей программе:

1-й этап (1 цикл): денатурация ($t = 1$ мин, $T = 96$ °C); 2-й этап (40 циклов): денатурация ($t = 10$ с, $T = 96$ °C); отжиг ($t = 5$ с, $T = 50$ °C); элонгация ($t = 3$ мин, $T = 60$ °C); 3-й этап (1 цикл): охлаждение реакционной смеси ($t = 5$ мин, $T = 4$ °C). Электрофоретический анализ продуктов секвенирующей реакции выполняли на базе генетического анализатора Applied Biosystems® 3500 (Thermo Scientific, США) согласно протоколу, рекомендованному изготовителем.

Анализ полученных данных проводили при помощи программного обеспечения и онлайн-сервисов: геномная сборка и аннотация – Ion Torrent Suite v. 4.0, MITOS Web Server (Bernt et al., 2013), SnapGene 3.2.1, UGene 1.29; дизайн праймеров – NCBI Primer-BLAST (2020); анализ данных секвенирования по Сэнгеру – Sequencing Analysis 5.1.1, NCBI BLAST; сопоставление нуклеотидных последовательностей, вычисление показателей эволюционной дистанции, индексов бутстрэпа и построение дендрограмм – CLC sequence Viewer 8.0. Построение дендрограмм осуществлялось методами невзвешенного парного среднего (UPGMA) и ближайшего присоединения соседей с использованием моделей Т. Н. Jukes и С. R. Cantor (1969), М. Kimura (1980) и бутстрэп-анализа (100 повторов). Создание TCS-сетей гаплотипов и статистический анализ, включающий тесты F. Tajima (1989) и Y. X. Fu, W. H. Li (1993) – DNASP6, PopART (2020); 3D-моделирование и изучение структуры белковых молекул проводилось на базе онлайн-сервисов NCBI, CDART и Molbiol-Tools с применением модели SWISS-MODEL.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе проведенного секвенирования мтДНК суммарного образца вершинного короёда и последующей биоинформационной обработки данных получена консенсусная последовательность митохондриального генома вершинного короёда, депонированная в международной базе генетических данных NCBI GenBank (регистрационный номер MK988441). Дальнейшее изучение структурно-функциональной организации мтДНК позволило идентифицировать в ней ген, детерминирующий первую субъединицу митохондриальной цитохром с-оксидазы (*mtCOI*) размером 1501 н. о. Одна из особенностей гена *mtCOI* вершинного короёда – наличие



Рис. 1. Выровненные последовательности прочтений гена *mtCOI* суммарного образца вершинного короеда (фрагмент).

в стартовом кодоне вместо широко используемого триплета «ATG» альтернативной последовательности «ATT». Несмотря на отсутствие данной особенности у близкородственных видов короеда-типографа *I. typographus* Linnaeus и шестизубчатого короеда, замещение триплетов «ATG» → «ATT» в стартовом кодоне *mtCOI* также отмечается у многих групп насекомых (Fearnley, Walker, 1987).

Предварительный анализ результатов выравнивания прочтений мтДНК суммарного образца вершинного короеда выявил у гена *mtCOI* наличие среднего (по сравнению с другими изученными нами митохондриальными локусами) уровня нуклеотидного полиморфизма – 8.3 SNPs на 100 н. о., связанных в основном с различными вариантами нуклеотидных замещений (рис. 1).

Среди белок-кодирующих локусов в ходе текущего исследования наиболее переменным оказался ген *mtatp8* – 11.3 SNPs на 100 н. о. Наименьшая степень изменчивости выявлена для *mtCOII* – 5.6 SNPs на 100 н. о.

Изучение регионов мтДНК, используемых в качестве универсальных областей отжига праймеров для ПЦР-амплификации фрагмента гена *mtCOI* (Folmer et al., 1994), показало, что в пределах исследованной выборки вершинного короеда они являются консервативными, однако характеризуются наличием неполной комплементарности к олигонуклеотидным последовательностям (LCO1490 и HCO2198), представленным в унифицированных протоколах молекулярно-генетического анализа различных групп насекомых (DNA..., 2012).

Таким образом, на основании полученных результатов секвенирования митохондриального генома вершинного короеда видно, что ген *mtCOI* является полиморфным и представляет собой информативный ДНК-маркер применительно к популяционным исследованиям вершинного короеда. В то же время использование общепринятых универсальных праймеров (LCO1490 и HCO2198) для его ПЦР-амплификации является нецелесообразным, что требует оптимизации

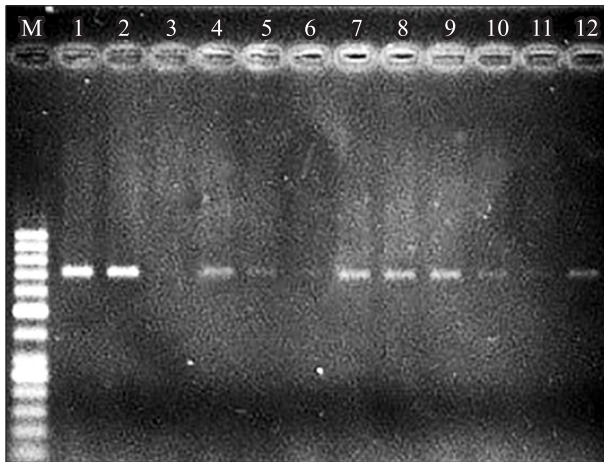


Рис. 2. Фрагмент ПЦР-спектра образцов вершинного короёда с универсальными праймерами LCO-1490/HCO-2198 ($T_a = 55^\circ\text{C}$): М – маркер молекулярной массы (50–1000 п. н.); 1, 2 – суммарный образец вершинного короёда; 3–12 – единичные особи вершинного короёда (Чечерский спецлесхоз).

дизайна последовательностей путем внесения видоспецифичных нуклеотидных позиций при условии сохранения основных термодинамических параметров олигонуклеотидов (рис. 2).

Апробация оптимизированных праймеров (LCO-ACUM 5'-TCTCCACTAACCACAAGGATATTGG-3'/ HCO-ACUM 5'-TAAACTTCTGGATGTCCAAAAATCA-3') показала их результативность во всех исследованных образцах – коэффициент эффективности ПЦР составил 1.89–1.92 (рис. 3).

Последующий молекулярно-генетический анализ для каждой особи вершинного короёда проводился по отдельности и был основан на ПЦР-амплификации фрагмента (координаты нуклеотидных позиций – 1–690) гена *mtCOI*, обозначаемого как локус *mtCOI*, его секвенировании, выравнивании последовательностей относительно консенсусного генотипа, детекции и типировании однонуклеотидных полиморфизмов (SNP).

Проведенное исследование трех популяций вершинного короёда позволило идентифицировать по локусу *mtCOI* 18 вариантов гаплотипов. Характеристики нуклеотидной структуры идентифицированных гаплотипов приведены в табл. 1.

В качестве референсного образца использован гаплотип № 1, имеющий наибольшую частоту встречаемости в исследованной выборке. Нуклеотидные характеристики гаплотипов 2–18 представлены в виде отличительных SNP относительно референсной последовательности.

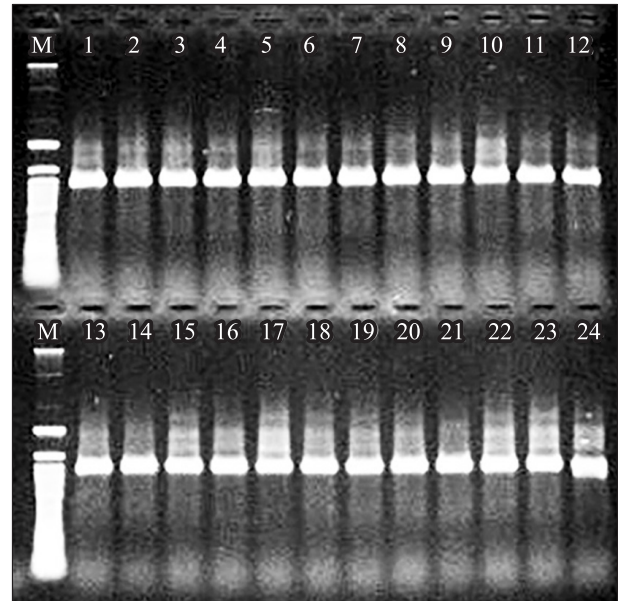


Рис. 3. ПЦР-спектр образцов вершинного короёда с модифицированными праймерами HCO-ACUM/LCO-ACUM ($T_a = 55^\circ\text{C}$): М – маркер молекулярной массы (50–1350 п. н.); 1–24 – единичные особи вершинного короёда (Чечерский спецлесхоз).

Как следует из табл. 1, особенности нуклеотидной структуры всех гаплотипов (кроме № 9) в подавляющем большинстве связаны с нуклеотидными заменами. Уровень различий между нуклеотидными последовательностями гаплотипов широко варьировал и составлял от 1 до 46 позиций в абсолютном исчислении или 0.001–0.066 – в относительном. Графическое отображение результатов кластеризации по уровню нуклеотидного подобия для всех выявленных вариантов гаплотипов приведено на рис. 4.

Как видно из структуры дендрограммы (см. рис. 4), ряд гаплотипов (№ 1–3) выявлен более чем в одной выборке и характеризовался высокой частотой встречаемости, что указывает на общность происхождения исследованных популяций вершинного короёда (рис. 5).

Другие группы гаплотипов диагностированы только в одной определенной локации, формировали на дендрограмме отдельные кластеры по уровню генетического подобия, что, на наш взгляд, указывает на их происхождение не вследствие миграции извне, а за счет микроэволюционных событий, протекающих в изученных популяциях вершинного короёда.

Для исследования филогенетических взаимоотношений исследованных гаплотипов вершинного короёда использован метод медианных сетей (см. рис. 5). Исключение составили гап-

Таблица 1. Нуклеотидная структура гаплотипов вершинного короеда

№ гаплотипа	Нуклеотидные характеристики
1	ATTGGAACATTATATATTTTATTTTTGGAGCATGATCAGGAATAGTGGGGACATCCTTAAG AATACTGATTTCGAACTGAACTTGGAACACCTAAAAAGTTTAATTGGAGATGATCAAATT TTTAATACTATATTACAGCCCATGCTTTTCATTATAATTTTTTTTATAGTTATACCTATTTT AATTGGAGGATTTGGAAATTGACTTGTACCTTTAATATTAGGTGCGCCAGATATAGCAT TTCCCGATTAATAATATAAGATTTTGACTTCTTCCACCCTCTTAAATTCTTCTAATTA TAAGAAGAATTATTGATAAAGGAATAGGAACAGGCTGAACTGCCTATCCCCCCTCTC TGCTAATATTTACATGAAGGAATATCAGTAGATCTTGCTATTTTTAGATTACATTTATCA GGTATTTTCATCAATTTTAGGAGCTATTAATTTTATTTCTACAATTATTAATATACATCCAA AAGGTGTAACCTCTGAACAATTAACCTTTTTACTTGAGCAGTAAAAAATTAAGTCAATT CTTCTTCTTATTTTCTTACCTGTACTTGTGGAGCAATTACAATACTTTTAAACAGATCGA AATATTAATACCTCTTTCTTCCGACCCGGCAGGAGGAGGAGACCCAATCTTTACCAAC ATTTATTTTGATTTTTTGGACATCCAGAAGTTTAT
2	51С
3	29Т
4	29Т, 51С
5	<i>Отсутствуют данные региона 1–75 н. о.; 116С, 176С, 367G, 369G, 567С</i>
6	48Т, 64Т, 66А, 90А, 97С, 111С, 120С, 130G, 168А, 217С, 225А, 276С, 287С, 316С, 322G, 323С, 333Т, 341Т, 342Т, 345С, 351Т, 366С, 367G, 372С, 380С, 391G, 397G, 402С, 411С, 412А, 426С, 447С, 474С, 486Т, 489С, 492С, 547С, 552Т, 579С, 601G, 603А, 624А, 645С
7	48Т, 64Т, 66А, 90А, 97С, 111С, 120С, 130G, 168А, 217С, 225А, 276С, 287С, 316С, 322G, 323С, 333Т, 341Т, 342Т, 345С, 351Т, 366С, 367G, 372С, 380С, 391G, 402С, 411С, 412А, 426С, 447С, 474С, 486Т, 489С, 492С, 547С, 552Т, 579С, 601G, 603А, 624А, 645С
8	48Т, 51С, 64Т, 97С, 111С, 120С, 130G, 168А, 217С, 225А, 276С, 286G, 287С, 297С, 316С, 322G, 323С, 333Т, 341Т, 342Т, 345С, 351Т, 366С, 367G, 372С, 380С, 391G, 402С, 412А, 426С, 447С, 474С, 486Т, 489С, 492С, 547С, 552Т, 579С, 601G, 603А, 624А, 645С
9	48С, 51С, 64Т, 87G, 97С, 111С, 120С, 130G, 154, 163dupТ, 168А, 217С, 225А, 276С, 286G, 287С, 316С, 322G, 323С, 333Т, 341Т, 342Т, 345С, 351Т, 366С, 367G, 380С, 391G, 392С, 397G, 402С, 408G, 411С, 412А, 426С, 447С, 474С, 486Т, 489С, 492С, 547С, 552Т, 579С, 601G, 603delA, 604G, 605Т
10	<i>Отсутствуют данные региона 1–75 н. о.; 120С, 130G, 225А, 286G, 287С, 316С, 322G, 323С, 341Т, 342Т, 345С, 350Т, 367G, 380С, 391G, 402С, 411С, 412А, 447С, 474С, 547С, 601G, 603А, 645С</i>
11	48Т, 51С, 64Т, 66А, 97С, 111С, 120С, 123С, 130G, 138Т, 144С, 177С, 204С, 217С, 225А, 240С, 287С, 297С, 322G, 323С, 333Т, 341Т, 342А, 345С, 348Т, 366С, 367G, 380С, 384G, 402С, 412А, 426С, 438G, 447С, 483А, 492С, 547С, 553С, 579Т, 601G, 603А, 624А, 639Т
12	48Т, 64Т, 66А, 97С, 111С, 120С, 123С, 130G, 138Т, 144С, 177С, 204С, 225А, 240С, 287С, 297С, 322G, 323С, 333Т, 341Т, 342А, 345С, 348Т, 366С, 367G, 380С, 384G, 402С, 412А, 426С, 438G, 447С, 483А, 492С, 547С, 553С, 579Т, 601G, 603А, 624А, 639Т
13	48Т, 51С, 64Т, 66А, 97С, 111С, 120С, 123С, 130G, 138Т, 144С, 177С, 195G, 204С, 217С, 225А, 240С, 287С, 297С, 322G, 323С, 333Т, 341Т, 342А, 345С, 348Т, 366С, 367G, 380С, 384G, 402С, 412А, 426С, 438G, 447С, 483А, 547С, 553С, 579С, 601G, 603А, 624А, 639Т
14	48Т, 64Т, 66А, 97С, 111С, 120С, 123С, 130G, 138Т, 144С, 177С, 195G, 204С, 217С, 225А, 240С, 287С, 297С, 322G, 323С, 333Т, 341Т, 342А, 345С, 348Т, 366С, 367G, 380С, 384G, 402С, 412А, 426С, 438G, 447С, 483А, 547С, 553С, 579С, 601G, 603А, 624А, 639Т
15	48Т, 64Т, 66А, 97С, 111С, 120С, 123С, 130G, 138Т, 144С, 177С, 204С, 213G, 217С, 225А, 240С, 287С, 297С, 322G, 323С, 333Т, 341Т, 342А, 345С, 366С, 367G, 380С, 384G, 402С, 412А, 426С, 438G, 447С, 483А, 547С, 553С, 579Т, 601G, 603А, 624А, 639Т
16	48Т, 64Т, 97С, 111С, 120С, 123С, 130G, 138Т, 144С, 177С, 204С, 213G, 217С, 225А, 240С, 287С, 297С, 322G, 323С, 333Т, 341Т, 342А, 345С, 366С, 367G, 380С, 384G, 402С, 412А, 426С, 438G, 447С, 483А, 547С, 553С, 579Т, 601G, 603А, 624А, 639Т
17	48С, 51С, 64Т, 66А, 97С, 120С, 123С, 130G, 138Т, 144С, 177С, 204С, 213G, 217С, 225А, 240С, 287С, 297С, 322G, 323С, 333Т, 341Т, 342А, 345С, 366С, 367G, 380С, 384G, 402С, 412А, 426С, 438G, 447С, 483А, 547С, 553С, 579Т, 601G, 603А, 624А, 639Т
18	<i>Отсутствуют данные региона 1–123 н. о.; 130G, 138Т, 144С, 177С, 204С, 217С, 225А, 240С, 287С, 297С, 322G, 323С, 333Т, 341Т, 342А, 345С, 366С, 367G, 380С, 384G, 402С, 412А, 426С, 438G, 447С, 483А, 547С, 553С, 579Т, 601G, 603А, 624А, 624А, 639Т</i>

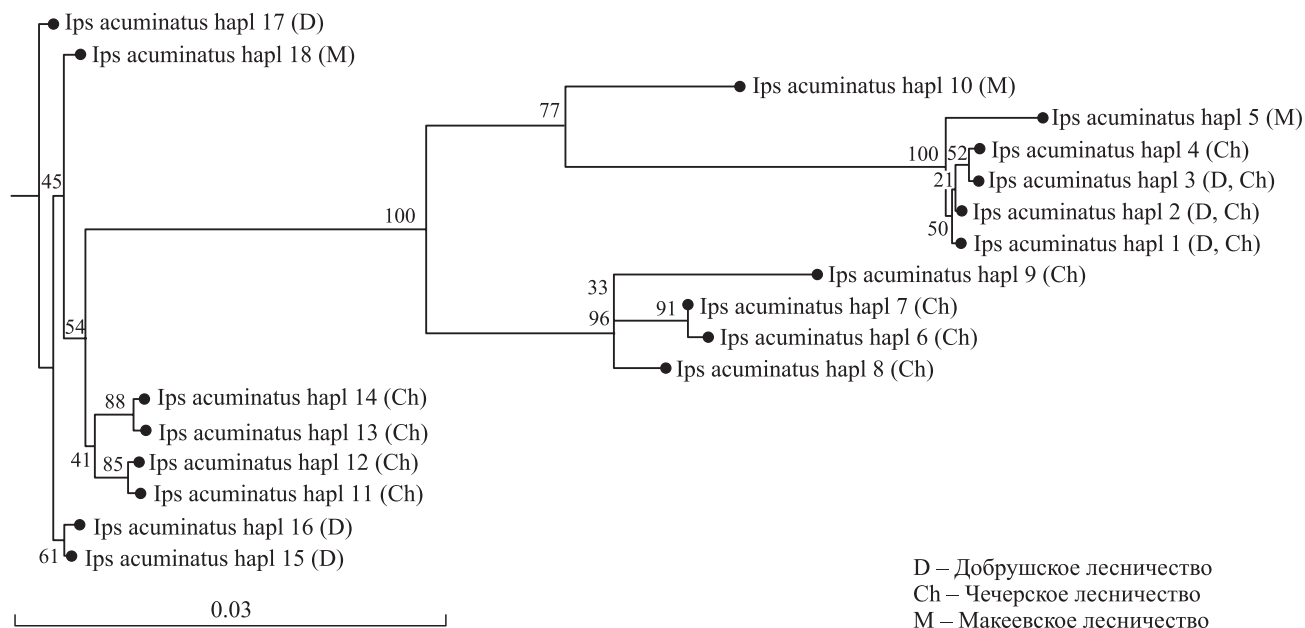


Рис. 4. Дендрограмма, иллюстрирующая распределение выявленных гаплотипов вершинного короёда по уровню подобия их нуклеотидных структур (метод кластеризации NJ: JC; в основании ветвей приведены значения бутстрэпа).

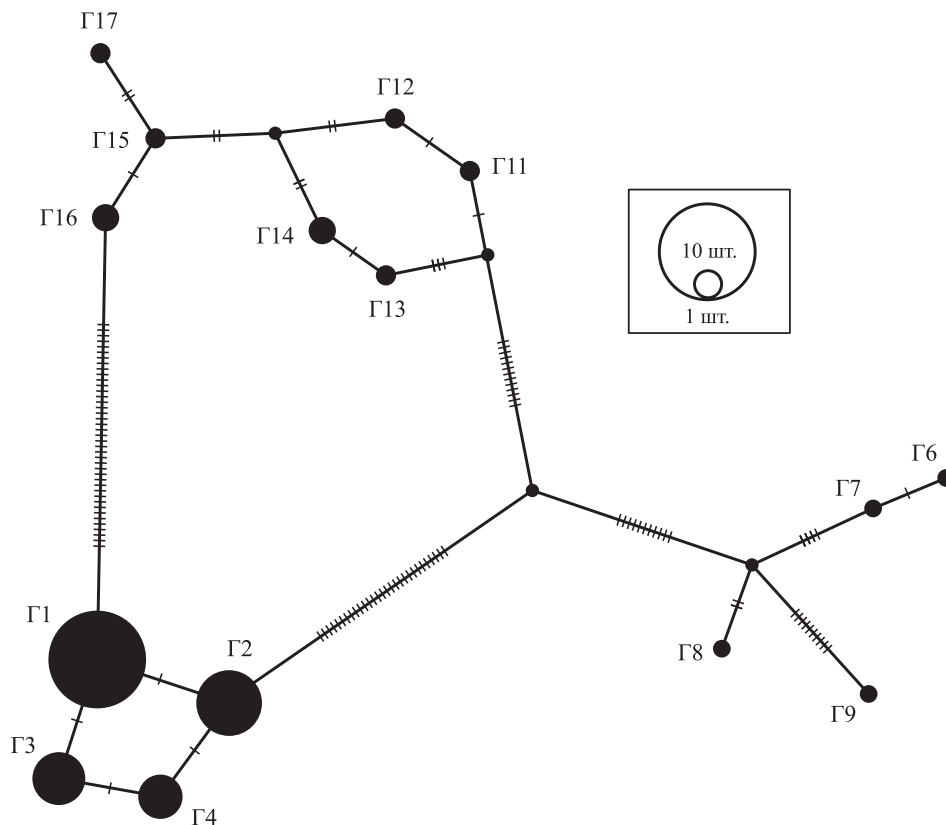


Рис. 5. Медианная сеть *mtCOI*-гаплотипов вершинного короёда с использованием алгоритма TCS (Clement et al., 2000; PopART, 2020).

Таблица 2. Результаты сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей выявленных гаплотипов с образцами базы данных NCBI GenBank

Образец вершинного короёда	Авторы (страна)	Номер NCBI	Перекрытие	Идентичность
			%	
ZFMK-TIS-2526767	B. Rulik, D. Ahrens (Германия)	KU916950.1	95	92.40–100
ZFMK-TIS-2526915		KU910832.1	95	92.55–99.85
ZMUO<FIN>:004815	M. Pentinsaari и др. (Финляндия)	KJ965012.1	95	93.01–97.57
IpIps02	V. H. Jordal и др. (Норвегия)	HQ883661.1	69–84	92.08–99.79
6П2	K. Sikora и др. (Польша)	MK315159.1	59–72	92.01–100
6П3		MK315163.1	59–72	92.01–99.52

типы № 5, 10 и 18, что связано с отсутствием для них полной последовательности локуса mtCOI (см. табл. 1).

Нуклеотидное разнообразие, рассчитанное в программном обеспечении DnaSP6 по тестам F. Tajima (1989) и Y. X. Fu, W. H. Li (1993), составило $\pi \pm SD = 0.03 \pm 0.01$. Гаплотипическое разнообразие $Hd \pm SD$ характеризовалось при этом более высоким показателем 0.77 ± 0.04 . Среднее количество парных нуклеотидных различий $k = 21.19$; Fu & Li's $D^* = -7.24$ ($P < 0.02$); Fu & Li's $F^* = -6.34$ ($P < 0.02$); Tajima's $D = -2.49$ ($P < 0.01$); Fu's (1997) $F_s = 13.84$. Полученные отрицательные значения показателей D и F статистических тестов F. Tajima (1989) и Y. X. Fu, W. H. Li (1993) могут быть обусловлены как селективными характеристиками гаплотипических вариантов (определяться процессами селективной развертки (преимущества) – *англ.* «selective sweep», генетического автостопа – *англ.* «genetic hitchhiking» применительно к выявляемым SNPs), так и колебаниями численности популяций (за счет эффекта бутылочного горлышка – *англ.* «population bottleneck»).

Кроме сравнительного анализа выявленных гаплотипов нами проведен анализ секвенированных последовательностей в базе данных NCBI GenBank для выявления аналогичных вариантов за пределами изученных локаций. Результаты поиска приведены в табл. 2.

Как и ожидалось, ряд гаплотипов у проанализированных особей характеризовался генетическим сходством с образцами, собранными в Польше, Германии, Финляндии и Норвегии, что указывает на филогенетическую общность европейских популяций вершинного короёда, а выявляемый полиморфизм mtCOI может быть использован для проведения сравнительного анализа популяций и установления путей расселения вредителя в историко-хронологическом аспекте.

Исходя из полученных результатов статистических тестов F. Tajima (1989) и Y. X. Fu, W. H. Li (1993), идентифицированные мутационные события, лежащие в основе формирования гаплотипического разнообразия mtCOI вершинного короёда, могут не носить нейтральный характер, что делает актуальной оценку функциональной значимости однонуклеотидных полиморфизмов, потенциально способных отражаться на физиологической активности насекомых и, следовательно, степени их вредоносности. С данной целью нами произведена оценка влияния нуклеотидных изменений на первичную структуру кодируемой полипептидной цепи (табл. 3).

Как следует из табл. 3, общее количество полиморфных сайтов составило 71, в 16 из которых замещения привели к смене аминокислоты в полипептидной цепи. При этом все несинонимичные SNP затрагивали 1-ю и 2-ю позиции кодонов. В случаях наличия в триплетах одновременно двух полиморфных сайтов замены в 3-й позиции оказались синонимичными (342-я позиция), в то время как замены в 1-й и 2-й позициях в комплексе приводили к появлению в цепи новой аминокислоты, отсутствующей в случае возникновения только одной из них (322-я и 323-я позиции). Также следует отметить, что появление по причине SNP в нуклеотидной цепи триплета АТА (323-я и 380-я позиции гена) привело к встраиванию в белковую молекулу метионина вместо изолейцина, что свойственно митохондриальному коду, в том числе и у беспозвоночных (Sengupta et al., 2007).

Всего в изученных гаплотипах детектировано 56 транзиций, из которых 12 оказались несинонимичными, и 18 трансверсий, из которых к смене аминокислоты привели только 4. В 68 % случаев замена произошла в 3-й позиции кодона, 20 % – в 1-й и 12 % – во 2-й, что согласуется с литературными данными для различных групп насекомых (Castle, 2011).

Таблица 3. Детекция SNP в исследуемых гаплотипах вершинного короеда

Позиция в гене	Замена кодона	Позиция в кодоне	Замена аминокислоты	Тип мутации	Количество гаплотипов
1	2	3	4	5	6
29	GCA>GTA	2	A/V	Транзиция	2
48	GGT>GGC	3	–	»	2
48	GGT>GGG	3	–	Трансверсия	4
51	ACA>ACC	3	–	»	7
64	TTA>CTG	1	–	Транзиция	4
66	TTA>TTG	3	–	»	6
87	ACA>ACG	3	–	»	1
90	CCT>CCA	3	–	Трансверсия	2
97	CTA>TTA	1	–	Транзиция	6
111	GAC>GAT	3	–	»	6
116	ATT>ACT	2	I/T	»	1
120	TTC>TTT	3	–	»	5
123	AAT>AAC	3	–	»	7
130	GTT>ATT	1	V/I	»	5
138	GCC>GCT	3	–	»	8
144	GCT>GCC	3	–	»	8
168	GTT>GTA	3	–	Трансверсия	4
176	ATT>ACT	2	I/T	Транзиция	1
177	ATT>ATC	3	–	»	8
195	GGA>GGG	3	–	»	2
204	CTT>CTC	3	–	»	8
213	TTA>TTG	3	–	»	3
217	CTA>TTA	1	–	»	6
225	GCA>GCG	3	–	»	5
240	TTT>TTC	3	–	»	8
276	CCA>CCC	3	–	Трансверсия	4
286	ACT>GCT	1	T/A	Транзиция	3
287	ACT>ATT	2	T/I	»	5
297	ATC>ATT	3	–	v	9
316	AAA>CAA	1	K/Q	Трансверсия	5
322, 323	GCA>ATA	1, 2	A/M	Транзиция	5
333	GGT>GGC	3	–	»	6
341, 342	GTA>GCC	2, 3	V/A	Транз., трансв.	5
342	GTA>GTT	3	–	Трансверсия	4
345	TAC>TAT	3	–	Транзиция	5
348	CCC>CCT	3	–	»	4
350	CCC>CTC	2	P/L	»	1
351	CCC>CCT	3	–	»	4
366	ATC>ATT	3	–	»	6
367	GCA>TCA	1	A/S	Трансверсия	4
369	GCA>GCG	3	–	Транзиция	7
372	CAT>CAC	3	–	»	3
380	ACA>ATA	2	T/M	»	5
384	TCA>TCG	3	–	»	8
391	CTT>GTT	1	L/V	Трансверсия	5
392	GTT>GTC	3	–	Транзиция	1
397	ATT>GTT	1	I/V	»	2
402	TTC>TTT	3	–	»	5
408	TTA>TTG	3	–	»	1
411	CAT>CAC	3	–	»	4

Окончание табл. 3.

1	2	3	4	5	6
412	ATA>TTA	1	M/L	Трансверсия	5
426	TCC>TCA	3	–	»	6
439	GGA>GGG	3	–	Транзиция	7
447	AAC>AAT	3	–	»	5
474	CAT>CAC	3	–	»	5
483	GGT>GGA	3	–	Трансверсия	8
486	GTA>GTT	3	–	»	4
489	ACT>ACC	3	–	Транзиция	4
492	CCT>CCC	3	–	»	6
547	CTT>ATT	1	–	Трансверсия	5
552	TCC>TCT	3	–	Транзиция	4
553	TTA>CTA	1	–	»	8
567	GCT>GCC	3	–	»	1
579	ACC>ACT	3	–	»	6
579	ACC/T>ACA	3	–	Трансверсия	6
601, 603	GTA>ATT	1, 3	–	Транз., трансв.	5
604, 605	AAT>GTT	1, 2	–	»	1
624	CCA>CCG	3	–	Транзиция	6
639	GAC>GAT	3	–	»	8
645	ATT>ATC	3	–	»	4

Кроме того, в случае гаплотипа № 9 (гаплотип является сопутствующим в гетерогенном генотипе) выявлена комплексная перестройка нуклеотидной цепи, включающая 154–163dupT (дубликацию тимина в поли-Т мотиве) и 603delA (делеция аденина), что теоретически обуславливает смещение рамки считывания и приводит к изменению полипептидной цепи с 54-й по 201-ю позицию и к дальнейшим возвращением к исходной последовательности. Белок с такой аминокислотной структурой является нефункциональным и не обладает цитохром с-оксидазной активностью, что не может не отражаться на физиологическом состоянии особей насекомых. Тем не менее данная перестройка может элиминироваться в ходе редактирования пре-мРНК (по механизму вставки/делеции (Alfonzo et al., 1997) или другими способами),

приводя к получению функционального полипептида. Для подтверждения высказанных предположений о РНК-редактировании необходимо проведение секвенирования транскрипта данного гаплотипа, что станет целью дальнейших изысканий.

Кроме изучения первичной структуры детерминируемых функциональных аллоформ полипептидов в ходе исследований проводилось 3D-моделирование структуры белковых молекул на базе онлайн-сервиса Molbiol-Tools с использованием модели SWISS-MODEL.

Некоторые из полученных 3D-моделей для исследованных гаплотипов представлены на рис. 6.

Согласно построенным картам G. N. Ramachandran et al. (1963), во всех случаях значения торсионных углов располагались в четырех ко-

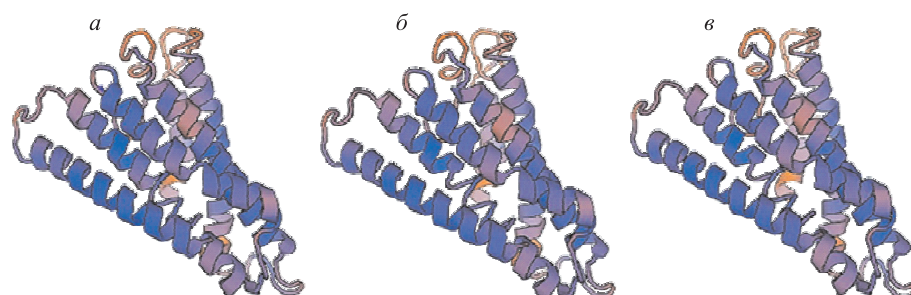


Рис. 6. 3D-моделирование структуры белковых молекул исследованных COI-гаплотипов на базе онлайн-сервиса Molbiol-Tools: *a* – гаплотип № 4; *b* – гаплотип № 8; *v* – гаплотип № 11.

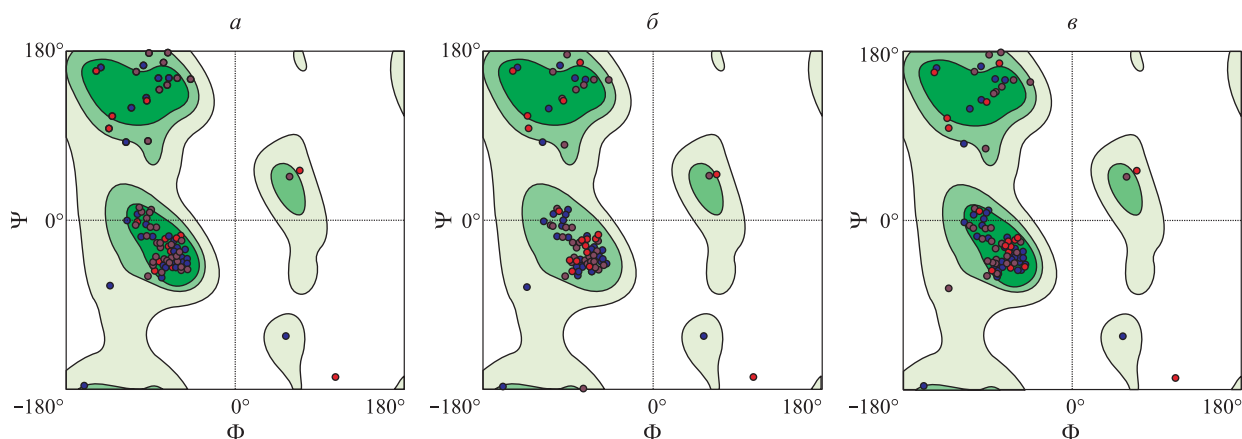


Рис. 7. Карты Рамачандрана белковых молекул исследованных *mtCOI*-гаплотипов: *a* – № 4; *б* – № 8; *в* – № 11.

ординатных плоскостях, но скученно отмечались преимущественно в третьей четверти, что свидетельствовало о характерном отрицательном значении углов ϕ и ψ для α -спиралей. Для остатков глицина и пролина картина оставалась сходной с общей. Существенные отклонения в торсионных углах, влияющие на конформацию полипептидных цепей цитохром с-оксидазы исследуемых *COI*-гаплотипов, выявлены не были (рис. 7).

Анализ пептидных последовательностей *mtCOI*-гаплотипов в базе данных NCBI CDART также показал, что, несмотря на имеющийся полиморфизм, архитектура функциональных доменов аллоформ остается неизменной.

Еще один из аспектов, имеющих потенциальную значимость для выявления генетических особенностей индивидов вершинного короёда, формирующих массовые очаги усыхания, – комплексное описание получаемых молекулярных данных по маркеру *mtCOI*. Детальное изучение индивидов вершинного короёда показало, что их можно разделить на две условные группы: у первой *mtCOI* представлен одним гаплотипическим вариантом, у второй – выявлялось два (в ряде случаев, вероятно, и более) различных варианта, что выражалось на электрофореграммах в виде эффекта наложения пиков, относящихся к разным типам нуклеотидов (рис. 8).

Долевое участие альтернативного варианта нуклеотидной последовательности в спектре у разных особей не было одинаковым и варьировало от 5 до 35 %.

Сравнительный анализ индивидов вершинного короёда, характеризующихся наличием смешанных нуклеотидных спектров, показал, что они также не являются однотипной группой, а могут быть классифицированы в зависимости

от сочетания выявляемых у них вариантов гаплотипов.

При этом у большинства выявленных особей, имеющих сходные (по нуклеотидному составу) типы смешанных спектров, долевое участие альтернативных гаплотипов было одинаковым. Данная особенность нами рассматривалась как наследуемый признак и обозначалась в виде отдельного генотипа. Все выявленные варианты генотипов (содержащие один или несколько гаплотипов) задепонированы в NCBI GenBank с присвоением регистрационных номеров MT215120–MT215133.

Возникновение смешанных электрофоретических спектров возможно вследствие гетероплазмии, вызванной попаданием в яйцеклетку отцовской мтДНК при оплодотворении, или мутационных процессов, затрагивающих отдельные копии мтДНК. Также полученные результаты могут быть интерпретированы с позиции генетической гетерогенности не молекул мтДНК целиком, а отдельных локусов в результате их переноса в ядерный геном и формирования областей, обозначаемых как ядерная митохондриальная ДНК (NUMTs), наследование и дифференциация которых происходят вне зависимости от мтДНК. Следует отметить, что, согласно литературным данным, частота протекания перечисленных процессов незначительна, а представленность в клетках альтернативных вариантов гаплотипов ниже (10–14 %) исходной мтДНК (Robison et al., 2015; Kang et al., 2016). Так, например, вероятность переноса ДНК из митохондрий в ядро у разных организмов варьирует, но оценена в диапазоне $5 \times 10^{-6} - 2 \times 10^{-5}$ на клетку в одном поколении (Thorsness, Fox, 1993; Hlaing, 2009; Dayama et al., 2014). В связи с этим вопрос о механизмах формирования и на-

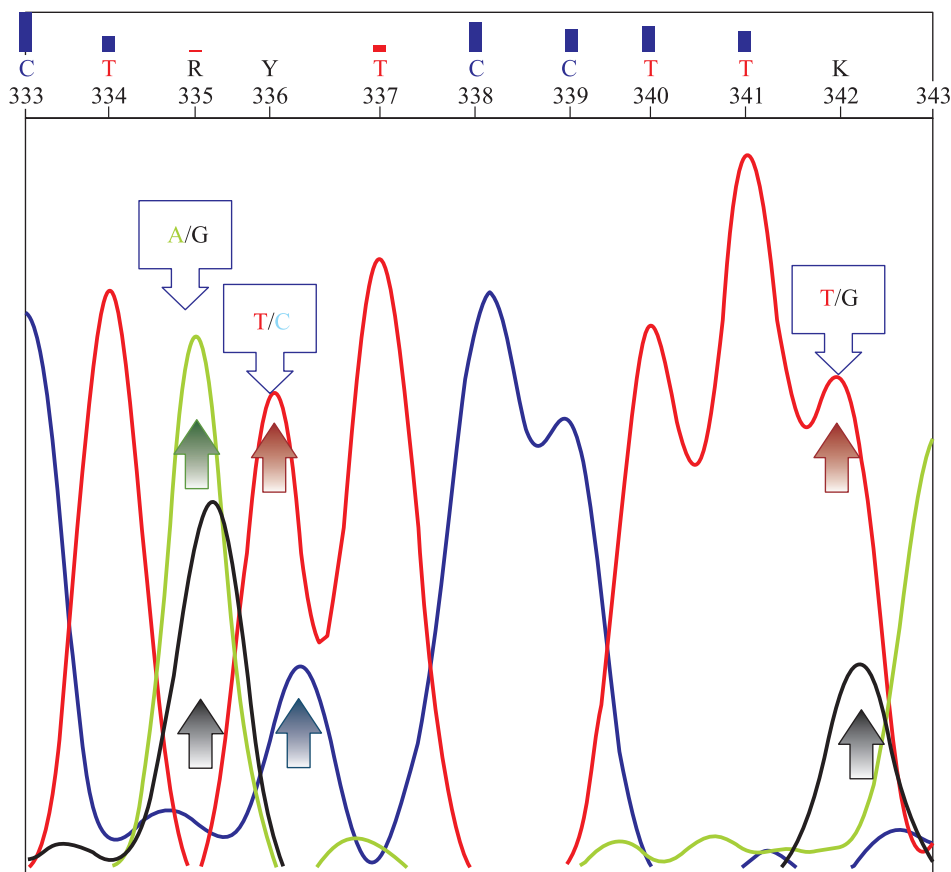


Рис. 8. Электрофореграмма фрагмента локуса mtCOI вершинного короёда («смешанный» генотип).

следования генотипов мтДНК с высоким уровнем гетерогенности остается дискуссионным. Анализ популяционно-генетической структуры исследованных очагов вершинного короёда показал, что суммарное количество особей, содержащих гетерогенные генотипы, составляло порядка 50 %.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании полученных результатов оценки генетического полиморфизма локуса mtCOI вершинного короёда в белорусских популяциях нами сделаны следующие выводы:

- локус mtCOI характеризуется средним уровнем изменчивости и, как следствие, информативности по сравнению с другими кодирующими локусами мтДНК вершинного короёда. В то же время выявленная степень генетического полиморфизма mtCOI является достаточной для проведения популяционно-генетических исследований вредителя, включая оценку его миграционной активности, что станет предметом дальнейших изысканий согласно методикам, представленным в литературных источниках

(Latorre et al., 1992; Freeland et al., 2003; Rosetti, Remis, 2012; Yeap et al., 2016; Pfeiler, Markow, 2017);

- высокий уровень представленности результатов анализа локуса mtCOI ($\approx 60\%$ от всего числа депонированных образцов) в международных генетических базах данных, зарегистрированных авторами из разных стран, дает возможность проводить сравнительный анализ между географически удаленными регионами (National Center..., 2020). Степень представленности других локусов мтДНК вершинного короёда (NADH, ATP и др.) в генетических банках не превышает 2-3 %, что затрудняет их использование на данный момент в качестве ДНК-маркеров для проведения популяционно-генетических исследований;

- для унификации проводимых популяционно-генетических исследований разработана система обозначения генотипов, основанная на особенностях нуклеотидной структуры mtCOI. Базовый перечень генотипов mtCOI вершинного короёда зарегистрирован в международной базе данных NCBI GenBank (MT215120–MT215133);

– для большинства выявленных вариантов гаплотипов (аллелей) *mtCOI* вершинного короёда не установлено (с помощью расчетных молекулярных моделей) наличие полиморфизма, оказывающего отрицательное воздействие на функциональность кодируемых ими аллоферментов, что, по всей видимости, определяет их относительную нейтральность (по отношению к действию отбора) и не оказывает существенного влияния при оценке популяционно-генетической структуры;

– кроме анализа параметров, характеризующих гаплотипическое разнообразие и генетическую структуру популяций вершинного короёда, при изучении очагов на разных стадиях развития будет также исследован и уровень «смешанных» генотипов, выявленных и описанных нами в текущей работе, что, по мнению ряда авторов, может являться показателем, оказывающим влияние на динамику численности популяции (Robison et al., 2015).

Дальнейшие исследования направлены на расширение унифицированного перечня выявляемых гапло- и генотипических вариантов, характеризацию генетической структуры очагов вершинного короёда и оценку степени миграционной активности вредителя.

Работа выполнена в рамках инвестиционного проекта Министерства лесного хозяйства Республики Беларусь (договор от 31.05.2019 б/н).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ (REFERENCES)

- Падутов В. Е., Баранов О. Ю., Воронаев Е. В. Методы молекулярно-генетического анализа. Минск: Юнипол, 2007. 176 с. [Padutov V. E., Baranov O. Yu., Voronayev E. V. Metody molekulyarno-geneticheskogo analiza (Methods of molecular-genetic analysis). Minsk: Yunipol, 2007. 176 p. (in Russian)].
- Сазонов А. А., Звягинцев В. Б. «Биологический пожар» соснового леса // Лесн. и охотн. хоз-во. 2016. № 6. С. 9–13 [Sazonov A. A., Zvyagintsev V. B. «Biologicheskii pozhar» osnovnogo lesa («Biological fire» of a pine forest) // Lesn. i okhotn. khoz-vo (Forest and hunting economy). 2016. N. 6. P. 9–13 (in Russian)].
- Alfonzo J. D., Thiemann O. H., Simpson L. W. The mechanism of U insertion/deletion RNA editing in kinetoplast mitochondria // Nucl. Acids Res. 1997. V. 25. Iss. 19. P. 3751–3759.
- Avtzis D. N., Lakatos F., Gallego D., Pernek M., Faccoli M., Wegensteiner R., Stauffer C. Shallow genetic structure among the European populations of the six-toothed bark beetle *Ips sexdentatus* (Coleoptera, Curculionidae, Scolytinae) // Forests. 2019. V. 10. Iss. 2. P. 1–10.
- Bark beetles: biology and ecology of native and invasive species / F. E. Vega, and R. W. Hofstetter (Eds.). Elsevier Acad. Press, 2015. P. 351–359.
- Bentz B. J., Regniere J., Fettig C. J., Hansen E. M., Hayes J. L., Hicke J. A., Kelsey R. G., Negron J. F., Seybold S. J. Climate change and bark beetles of the western United States and Canada: direct and indirect effects // Bioscience. 2010. V. 60. N. 8. P. 602–613.
- Bernt M., Donath A., Juhling F., Externbrink F., Florentz C., Fritsch G., Putz J., Middendorf M., Stadler P. F. MITOS: improved de novo metazoan mitochondrial genome annotation // Mol. Phylogenet. Evolut. 2013. V. 69. Iss. 2. P. 313–319.
- Castle J. C. SNPs occur in regions with less genomic sequence conservation // PLoS One. 2011. V. 6. Iss. 6. Article number: e20660. P. 1–12.
- Clare E. L., Lim B. K., Engstrom M. D., Eger J. L., Hebert P. D. DNA barcoding of Neotropical bats: species identification and discovery within Guyana // Mol. Ecol. Notes. 2007. V. 7. Iss. 2. P. 184–190.
- Clement M. D., Posada D., Crandall K. A. TCS: a computer program to estimate gene genealogies // Mol. Ecol. 2000. V. 9. Iss. 10. P. 1657–1659.
- Colombari F., Schroeder M. L., Battisti A., Faccoli M. Spatio-temporal dynamics of an *Ips acuminatus* outbreak and implications for management // Agr. For. Entomol. 2013. V. 15. Iss. 1. P. 34–42.
- Dayama G., Emery S. B., Kidd J. M., Mills R. E. The genomic landscape of polymorphic human nuclear mitochondrial insertions // Nucl. Acids Res. 2014. V. 42. N. 20. P. 12 640–12 649.
- DNA barcodes: methods and protocols / W. J. Kress, and D. L. Erickson (Eds.). Humana Press, 2012. 370 p.
- Fearnley I. M., Walker J. E. Initiation codons in mammalian mitochondria: differences in genetic code in the organelle // Biochemistry. 1987. V. 26. P. 8247–8251.
- 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 // Mol. Marine Biol. Biotechnol. 1994. V. 3. N. 5. P. 294–299.
- Freeland J. R., May M., Lodge R., Conrad K. F. Genetic diversity and widespread haplotypes in a migratory dragonfly, the common green darner *Anax junius* // Ecol. Entomol. 2003. V. 28. N. 4. P. 413–421.
- Fu Y. X. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection // Genetics. 1997. V. 147 (2). P. 915–925.
- Fu Y. X., Li W. H. Statistical tests of neutrality of mutations // Genetics. 1993. V. 133. N. 3. P. 693–709.
- Glaser J. A. Validity of nucleic acid purities monitored by 260 nm/280 nm absorbance ratios // BioTechn. 1995. V. 18. N. 1. P. 62–63.
- Hlaing T., Tun-Lin W., Somboon P., Socheat D., SETHA T., Min S., Chang M. S., Walton C. Mitochondrial pseudogenes in the nuclear genome of *Aedes aegypti* mosquitoes: implications for the past and future population genetic studies // BMC Genet. 2009. V. 10. N. 11. P. 1–12.
- Hlasny T., Krokene P., Liebhold A., Montagne-Huck C., Muller J., Qin H., Raffa K., Schelhaas M.-J., Seidl R., Svoboda M., Viiri H. Living with bark beetles: impacts, outlook and management options. From Science to Policy 8. Joensuu, Finland: EFI, 2019. 52 p.

- Jukes T. H., Cantor C. R. Evolution of protein molecules // Mammalian Protein Metabolism / H. N. Munro (Ed.). New York: Acad. Press, 1969. P. 21–132.
- Kang A. R., Kim M. J., Park I. A., Kim K. Y., Kim I. Extent and divergence of heteroplasmy of the DNA barcoding region in *Anapodisma miramae* (Orthoptera: Acrididae) // Mitochondrial DNA. A DNA Mapp. Seq. Anal. 2016. V. 27. N. 5. P. 3405–3414.
- Kerr K. C. R., Stoeckle M. Y., Dove C. J., Weigt L. A., Francis C. M., Hebert P. D. N. Comprehensive DNA barcode coverage of North American birds // Mol. Ecol. Notes. 2007. V. 7. Iss. 4. P. 535–543.
- Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences // J. Mol. Evolut. 1980. V. 16. N. 2. P. 111–120.
- Krivan V., Lewis M., Bentz B. J., Bewick S., Lenhart S. M., Liebhold A. A dynamical model for bark beetle outbreaks // J. Theor. Biol. 2016. V. 407. P. 25–37.
- Latorre A., Hernandez C., Martinez D., Castro J. A., Ramon M., Moya A. Population structure and mitochondrial DNA gene flow in Old World populations of *Drosophila subobscura* // Heredity. 1992. V. 68. P. 15–24.
- Meier R., Shiyang K., Vaidya G., Ng P. K. DNA barcoding and taxonomy in diptera: a tale of high intraspecific variability and low identification success // Syst. Biol. 2006. V. 55. Iss. 5. P. 715–728.
- Meyer C. P., Paulay G. DNA barcoding: error rates based on comprehensive sampling // PLoS Biol. 2005. V. 3. Iss. 12. Article number: E422. P. 2229–2238.
- National Center for Biotechnology Information, 2020. <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
- Pfeiler E., Markow T. A. Population connectivity and genetic diversity in long-distance migrating insects: divergent patterns in representative butterflies and dragonflies // Biol. J. Linnean Soc. 2017. V. 122. Iss. 2. P. 479–486.
- PopART, 2020. <https://popart.otago.ac.nz>
- Primer-BLAST. A tool for finding specific primers, 2020. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>
- Ramachandran G. N., Ramakrishnan C., Sasisekharan V. Stereochemistry of polypeptide chain configurations // J. Mol. Biol. 1963. V. 7. P. 95–99.
- Robison G. A., Balvin O., Schal C., Vargo E. L., Booth W. Extensive mitochondrial heteroplasmy in natural populations of a resurging human pest, the bed bug (Hemiptera: Cimicidae) // J. Med. Entomol. 2015. V. 52. N. 4. P. 734–738.
- Rosetti N., Remis M. I. Spatial genetic structure and mitochondrial DNA phylogeography of Argentinean populations of the grasshopper *Dichroplus elongatus* // PLoS One. 2012. V. 7. Iss. 7. Article number: e40807. P. 1–20.
- Sengupta S., Yang X., Higgs P. G. The mechanisms of codon reassignments in mitochondrial genetic codes // J. Mol. Evolut. 2007. V. 64. N. 6. P. 662–688.
- Sitonen J. *Ips acuminatus* kills pines in southern Finland // Silva Fenn. 2014. V. 48. N. 4. P. 1–7.
- Tajima F. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism // Genetics. 1989. V. 123. N. 3. P. 585–595.
- Tataurov A. V., You Y., Owczarzy R. Predicting ultraviolet spectrum of single stranded and double stranded deoxyribonucleic acids // Biophys. Chem. 2008. V. 133. N. 1–3. P. 66–70.
- Thorsness P. E., Fox T. D. Nuclear mutations in *Saccharomyces cerevisiae* that affect the escape of DNA from mitochondria to the nucleus // Genetics. 1993. V. 134. N. 1. P. 21–28.
- Ward R. D., Zemlak T. S., Innes B. H., Last P. R., Hebert P. D. DNA barcoding Australia's fish species // Phil. Trans. Royal Soc. B: Biol. Sci. 2005. V. 360. Iss. 1462. P. 1847–1857.
- Yeap H. L., Rasic G., Endersby-Harshman N. M., Lee S. F., Arguni E., Le Nguyen H., Hoffmann A. A. Mitochondrial DNA variants help monitor the dynamics of *Wolbachia* invasion into host populations // Heredity (Edinb). 2016. V. 116. Iss. 3. P. 265–276.

GENETIC POLYMORPHISM OF *mtCOI* LOCUS IN BELARUSSIAN POPULATIONS OF PINE BARK BEETLE *Ips acuminatus* Gyll.

S. V. Panteleev¹, L. V. Mozharovskaya¹, O. Yu. Baranov¹,
V. A. Yarmolovich², V. E. Padutov¹

¹ *Institute of Forest, National Academy of Sciences of Belarus
Proletarskaya str., 71, Gomel, 246050 Republic of Belarus*

² *Belarusian State Technological University
Sverdlov str., 13a, Minsk, 220006 Republic of Belarus*

E-mail: stasikdesu@mail.ru, milamozh@yandex.ru, betula-belarus@mail.ru,
yarm@belstu.by, forestgen@mail.ru

Sequencing and annotation of the pine bark beetle *Ips acuminatus* Gyll. mitochondrial genome (registration number in NCBI GenBank MK988441), including the insect barcoding marker – the part of the subunit I of mitochondrial cytochrome oxidase gene (*mtCOI*), were carried out. A comparative assessment of the level of polymorphism among *mtDNA* loci revealed that *mtCOI* has moderate level of variability. A preliminary study of the Belarusian populations of the pine bark beetle showed 18 haplotype variants at the *mtCOI* marker locus (*mtCOI* gene fragment). Significant portion of the studied individuals (50 %) were heteroplasmic – contained at least two *mtCOI* haplotypes in the genome together. Studying the level of genetic differentiation between haplotypes using the Jukes–Cantor (JC) and Kimura (K80) models revealed a wide range of variation in the values of the evolutionary distance indicator *D* – from 0.001 to 0.066, which corresponded to 1–46 nucleotide substitutions for the studied region (690 nr) in individual haplotypes. Analysis of the peptide sequences of the pine bark beetle *mtCOI* locus using 3D modeling technology, as well as using Ramachandran maps and the NCBI CDART database, showed that the domain architecture of the protein remains unchanged for the majority (94 %) of haplotypes and the functionality of allozymes is not violated, that indicates the relatively selectively neutral nature of the detected polymorphism. Based on the obtained total molecular genetic data, it was concluded that the degree of informational content of the *mtCOI* marker (based on *mtCOI*) is sufficient to carry out population-genetic studies of the pine bark beetle, including an assessment of its migration activity.

Keywords: *mitochondrial DNA, haplotype, sequencing.*

How to cite: Panteleev S. V., Mozharovskaya L. V., Baranov O. Yu., Yarmolovich V. A., Padutov V. E. Genetic polymorphism of *mtCOI* locus in belarussian populations of pine bark beetle *Ips Acuminatus* Gyll. // *Sibirskij Lesnoj Zhurnal* (Sib. J. For. Sci.). 2020. N 4. P. 15–29 (in Russian with English abstract and references).