

а – волос лисы,

б – волос немецкой овчарки

Рисунок 2 – Микроскопия рисунка кутикулы (Иммерсионный объектив увеличение x100).

Рисунок кутикулы диких псовых (рисунок 2(а)) визуализируется в виде кедровой шишки, чешуйки которой плотно прилегают друг к другу. У домашних псовых (рисунок 2(б)) кутикула имеет рисунок, напоминающий черепицу.

Проведенные исследования показали, что измененные характеристики шерстного покрова (длина волос, рисунок кутикулы) не могут служить абсолютным показателем для идентификации пород и, следовательно, такие методики лучше использовать в комплексе, для получения более точных результатов.

Литература

1 Абдулина, Е. В. Лабораторные методы исследования в судебно-медицинской экспертизе : учебное пособие / Е. В. Абдулина, В. В. Зыков, А. Е. Мальцев. – Киров : Кировский ГМУ, 2017. – 116 с.

2 Кухаренко, Н. С. Определение вида животных по волосу : учебно-методическое пособие / Н. С. Кухаренко. – Благовещенск : ДальГАУ, 2015. – 26 с.

3 Пасечник, Л. В. Окрасы собак. Генетические, биохимические и молекулярно-биологические аспекты / Л. В. Пасечник. – Харьков : Тим Паблиш Груп, 2012. – 128–130 с.

УДК 577.212

И. С. Чернышев

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ГЕНА CO1 КАК МАРКЕРНОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

*В статье представлены данные о исследовании гена CO1 *Vombis terrestris*, методике выделения и амплификации митохондриальной ДНК. В результате исследования была отработана методика выделения мтДНК, подобрана оптимальные параметры ПЦР-амплификации, в частности температура отжига (57° С), был выделен фрагмент гена CO1 *V. terrestris* длиной 446 н. п., пригодный для проведения ДНК-баркодирования.*

Митохондриальная ДНК является крайне ценным объектом для молекулярно-генетических исследований. Принцип наследования митохондрий, специфика мутационной изменчивости мтДНК и относительная лёгкость её выделения делают исследования митохондриального генома крайне удобными и доступными в различных областях науки [1, с. 2].

Митохондриальная ДНК богата на маркерные последовательности, а ген, кодирующий субъединицу 1 цитохром-с-оксидазы, является наиболее распространённым участком для проведения различных исследований, в частности ДНК-баркодирования [2, с. 77].

ДНК-баркодинг – метод молекулярно-генетической идентификации, крайне важный для определения принадлежности организма к определённому виду. Также данный метод позволяет выявлять и идентифицировать скрытые виды, определение которых иными, не молекулярно-генетическими, методами крайне затруднено [3, с. 314].

Такой анализ может быть крайне полезен в некоторых отраслях сельского хозяйства, таких как, например, шмелеводство. Возможность различать виды шмелей рода *Bombus*, трудноразличимые на ранних стадиях развития, в достаточной степени полезна для развития этой отрасли сельского хозяйства. Особей из естественных популяций используют, чтобы обогатить генофонд разводимых популяций, избежать инбридинга. Молекулярно-генетическое исследование может помочь с определением видовой и генотипической принадлежности отбираемых шмелей.

Цель работы – изучение гена COI как маркерной последовательности в молекулярно-генетических исследованиях.

Методика исследования включает выделение мтДНК модифицированным СТАВ-методом, подбор и апробацию праймеров *in silico* и *in vitro*, полимеразную цепную реакцию. Для апробации праймеров *in silico* использовались последовательности мтДНК из базы данных GenBank, работа проводилась в программах Unipro UGENE и Molecular Evolutionary Genetics Analysis.

Для исследования были отобраны образцы *Bombus terrestris* из коллекции кафедры биологии. Образцы были собраны в 2022 и 2023 году на территории УНБ «Чёнки».

Выделение ДНК производилось с помощью усовершенствованного СТАВ-метода.

Для амплификации были выбраны праймеры COI-for-Bt и COI-rev-Bt производства ОДО «Праймтех», представленные в таблице 1.

Таблица 1 – Используемые праймеры

Тип	Название	Нуклеотидная последовательность
Прямой	COI-for-Bt	5' -gaaacctttggaaatttaaga-3'
Обратный	COI-rev-Bt	5' -aattgaatttttaatcatttttga-3'

Перед непосредственным использованием праймеров для амплификации было проведено апробирование праймеров *in silico* (рисунок 1). По результатам апробирования можно сделать вывод о пригодности используемых праймеров для амплификации фрагмента в 446 н. п. из митохондриальной ДНК *Bombus terrestris*.

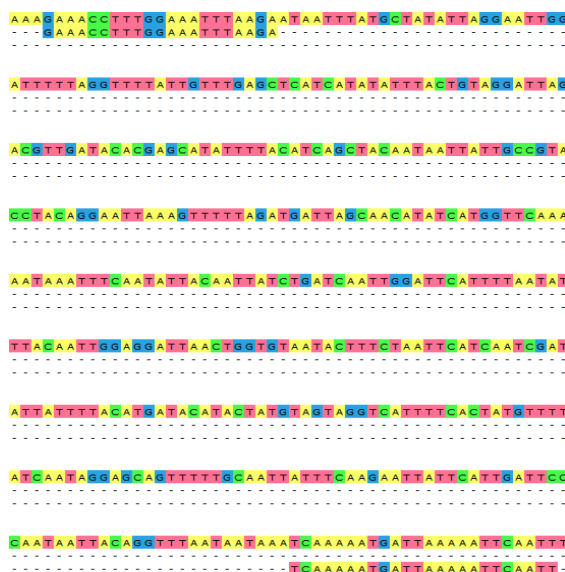


Рисунок 1 – Апробирование праймеров для *Bombus terrestris* (NC_045179) в UGENE

Далее была проведена проверка специфичности праймеров для некоторых видов рода *Bombus*, встречающихся на территории Республики Беларусь (рисунки 2, 3).

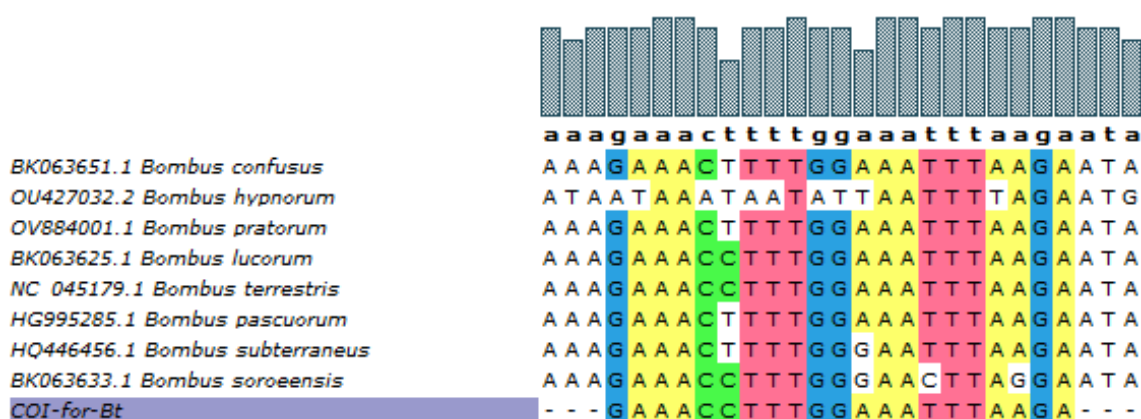


Рисунок 2 – Место прикрепления прямого праймера.
Цветом выделены совпадающие нуклеотиды

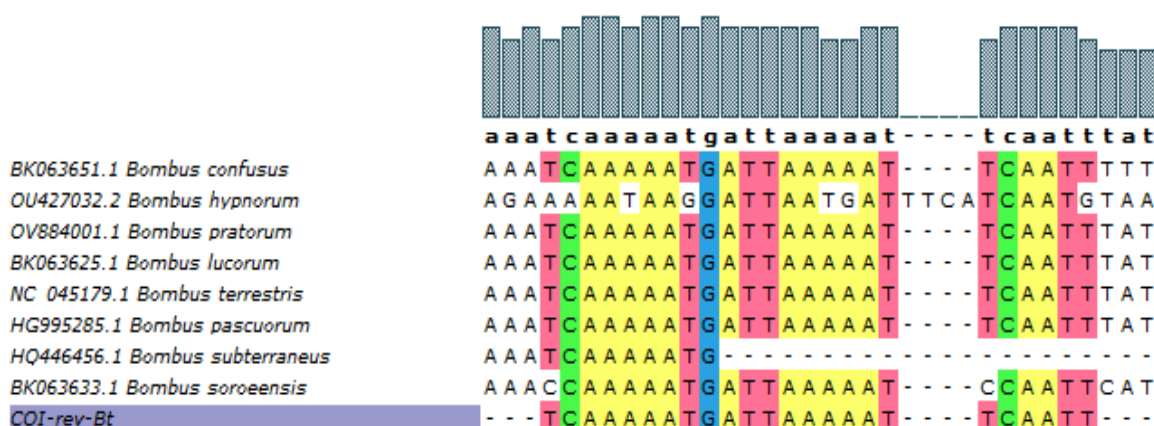


Рисунок 3 – Место прикрепления обратного праймера.
Цветом выделены совпадающие нуклеотиды

Данные виды, их таксономическое положение внутри рода *Bombus* и идентификатор GenBank представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Представители рода *Bombus*, использованные в исследовании

Подрод	Вид	Идентификатор GenBank
<i>Bombias</i>	<i>Bombus confusus</i>	BK063651
<i>Pyrobombus</i>	<i>Bombus hypnorum</i>	OU427032
	<i>Bombus pratorum</i>	OV884001
<i>Bombus (sensu stricto)</i>	<i>Bombus lucorum</i>	BK063625
	<i>Bombus terrestris</i>	NC_045179
<i>Thoracobombus</i>	<i>Bombus pascuorum</i>	HG995285
<i>Subterraneobombus</i>	<i>Bombus subterraneus</i>	HQ446456
<i>Kallobombus</i>	<i>Bombus soroensis</i>	BK063633

На основании полученных данных можно сделать вывод о низкой видоспецифичности полученных праймеров.

Согласно расчётам, оптимальная температура отжига для прямого праймера (COI-for-Bt) – 54° С, для обратного (COI-rev-Bt) – 54° С. Расчётная температура отжига – 54° С.

Для фактической проверки оптимальной температуры отжига была проведена градиентная ПЦР. При расчётной оптимальной температуре отжига в 54° С градиентная ПЦР проводилась в диапазоне температур от 52° С до 62° С (рисунок 4).

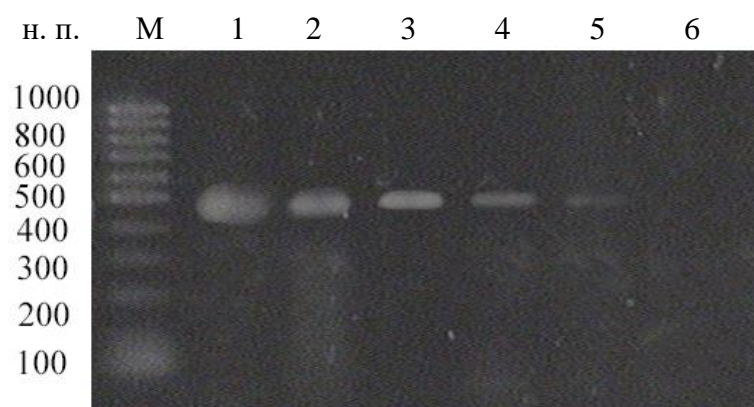


Рисунок 4 – Электрофореграмма образцов, амплифицированных при разной температуре отжига праймеров. 1 – 52 С, 2 – 54 С, 3 – 56 С, 4 – 58 С, 5 – 60°С, 6 – 62°С, М – Маркер 100 н. п.

Полученные данные позволяют сделать вывод об оптимальной температуре отжига для данных праймеров, которая составила 57°С.

В результате электрофореза в агарозном геле (рисунок 5) были получены следующие результаты:

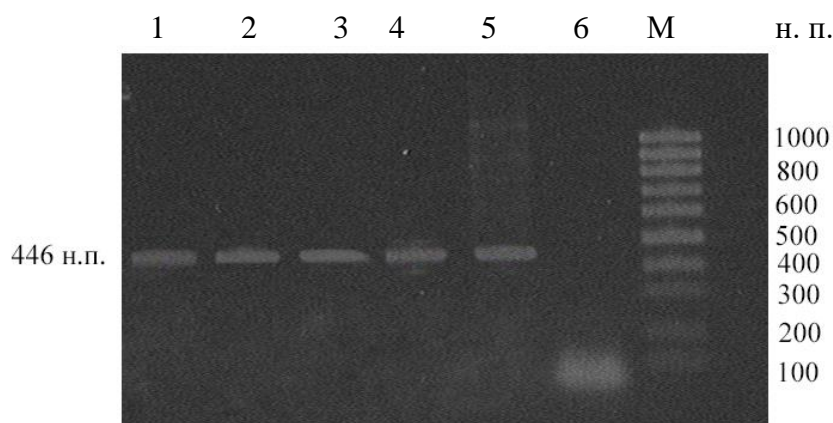


Рисунок 5 – Электрофореграмма ампликонов 446 н. п. *Bombus terrestris*

На дорожках 1–5 можно явно наблюдать амплифицированные фрагменты длиной 446 н. п.

Полученный фрагмент позволяет в дальнейшем проводить видовую идентификацию *B. terrestris* и *B. lucorum* с использованием рестриктазы Hinf I.

Заключение. В ходе исследования были получены участки гена CO1 размером 446 н. п., пригодные для проведения ДНК-баркодинга шмелей рода *Bombus* – *B. terrestris* и *B. lucorum*. Были отработаны методики выделения митохондриальной ДНК, методика проведения полимеразной цепной реакции. Были составлены и апробированы *in silico*,

in vitro подходящие для данной задачи праймеры, методом градиентной ПЦР, был подобран оптимальный температурный режим. Полученные в результате исследования данные позволяют судить о допустимости выделения модифицированным СТАВ-методом митохондриальной ДНК шмелей рода *Bombus*, пригодности праймеров COI-for-Bt и COI-rev-Bt для амплификации 446 н. п. последовательности участка гена CO1, возможности использования данного фрагмента для ДНК-баркодинга *B. terrestris* и *B. lucorum*.

Литература

1 Обзор свойств и методов исследования митохондриальной ДНК / Е. Н. Воропаева [и др.] // Journal of Siberian Medical Sciences. – 2016. – №3. – С. 8.

2 Potentiality of the COX1 gene in the taxonomic resolution of soil fungi / C. Molitor [et al.] // FEMS Microbiology Letters – 2010. – Vol. 302, iss. 1 – P. 76–84.

3 Biological identifications through DNA barcodes / P. Hebert [et al.] // Proc. Biol. Sci. – 2003. – Vol. 270, iss. 1512. – P. 313–321.

УДК 546.76:594.3:556.5(476.2-21Гомель)

Д. В. Шафранская

СОДЕРЖАНИЕ КОБАЛЬТА В ВЫСШИХ ВОДНЫХ РАСТЕНИЯХ ВОДОЕМА ГОРОДА ГОМЕЛЯ

В статье рассматривается вопрос о содержании и накоплении кобальта в высших водных растениях водоемов г. Гомеля. В результате исследований определены уровни содержания кобальта в высшей водной растительности г. Гомеля. В озерах Володькино и У-образное содержание кобальта в растениях превышало фон в 1,5–2,1 раза. В старичном комплексе превышение фоновой величины в 1,5 раза отмечено в 2020 г. Для растений участка реки выше черты города в 2021 г. концентрация металла в 2,3 раза было выше, чем фоновый показатель и только в оз. Шапор на протяжении всего периода исследований содержание кобальта в растениях не превышало фоновую величину.

Цель работы – изучить содержание кобальта в высших водных растениях водоемов г. Гомеля и прилегающих территориях.

Материалы и методы исследования. Исследования проводились на водоемах с различным характером антропогенной нагрузки. Для исследования были выбраны воздушно-водные растения: осока острая (*Carex acuta*), тростник южный (*Phragmites australis*), рогоз остролистный (*Typha angustifolia*), камыш озерный (*Schoenoplectus lacustris*). Отбор проводился согласно методике [1]. Растения исследовались без корневой системы. Перед доставкой в лабораторию растения тщательно ополаскивались в воде водоема для удаления загрязнения с листьев и стеблей. Исследования проводились в летний период (2019–2021 года). Определение содержания тяжелых металлов в пробах проводилось на базе Государственного научного учреждения «Институт радиобиологии НАН Беларуси» на масс-спектрометре с индуктивно-связанной плазмой с пробоподготовкой образцов в системе микроволнового вскрытия.

Для исследования были выбраны следующие водные экосистемы, имеющие различный характер антропогенной нагрузки: старичный комплекс, не имеющий видимой антропогенной нагрузки и расположенный на 10–12 км выше черты города по течению; оз. Володькино и участок р. Сож в д. Кленки, который расположен выше черты города; участок р. Сож в парковой зоне и ниже административной черты г. Гомеля принимает весь