

3. Наиболее зараженными оказались моллюски, выловленные на биотопе 1 (Старица реки Сож), общий процент заражения которых за июнь–июль 2015 г. составил 39,2 %.

4. Интенсивность инвазии определялась по числу сформированных партенит (спороцист, редий) и составила на биотопе 1 (Старица реки Сож) и биотопе 2 (река Сож) 5,0 и 5,4 экз. соответственно.

5. Среднее число паразитов, приходящихся на одну зараженную особь хозяина на 2 биотопах составило 2 экземпляра.

Литература

1 Грищенко, Л. И. Болезни рыб и основы рыбоводства / Л. И. Грищенко, М. Ш. Акбаев, Г. В. Васильков. – М.: Колос, 1999. – 456 с.

2 Шигин, А. А. Трематоды фауны СССР. Род *Diplostomum*. Метацеркарии / А. А. Шигин. – М.: Наука, 1986. – С. 22–25, 56–62, 80.

3 Беклемишев, В. Н. Биоценологические основы сравнительной паразитологии. – М.: Наука, 1970. – 520 с.

УДК 577.2: 575: 576.89

А. В. Дорох

МЕТОДИЧЕСКИЙ ПОДХОД К ПЦР-АНАЛИЗУ ДИПЛОСТОМИД

В ходе проведенных исследований были сконструированы и апробированы наиболее оптимальные праймеры для ПЦР-анализа диплостомид во вторых промежуточных хозяевах (рыбах сем. Карповые). Кроме того, были подобраны условия для гель-электрофореза фрагментов, полученных в результате амплификации.

Идентификация видов *Diplostomum spp.* весьма затруднена на всех стадиях жизненного цикла паразита вследствие их фенотипической пластичности, недостаточной изученности морфологических особенностей разных стадий развития, а также существующего сходства по многим признакам, в особенности это касается личиночных стадий. В связи с этим особую актуальность приобретает разработка методов ДНК-идентификации паразитов-диплостомид на любой стадии их жизненного цикла [1–2].

Цель работы: подобрать оптимальные условия для ПЦР-анализа рыб семейства карповые на зараженность диплостомидами.

Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи:

1. Охарактеризовать молекулярно-генетические маркеры, используемые для видовой идентификации трематод.

2. Сконструировать и апробировать наиболее оптимальные праймеры для ПЦР-анализа диплостомид.

3. Подобрать условия для гель-электрофореза фрагментов, полученных в результате амплификации.

Молекулярно-генетическая идентификация большинства известных трематод основывается на использовании следующих маркеров:

- ядерные (ITS1, ITS2);
- митохондриальные (CO1).

Установлено, что наиболее оптимальными молекулярно-генетическими маркерами, применяемыми для видовой идентификации диплостомид по мнению одних исследователей, является ITS1, а по мнению другой группы ученых, нужно использовать весь фрагмент, включающий ITS1-5,8S-ITS2.

Была взята отсеквенированная ранее последовательность участка ДНК представителей из рода *Diplostomum*, включающая участок 18S-ITS1-5,8S-ITS2-28S [2], используя данный фрагмент мы построили праймеры, следующего состава:

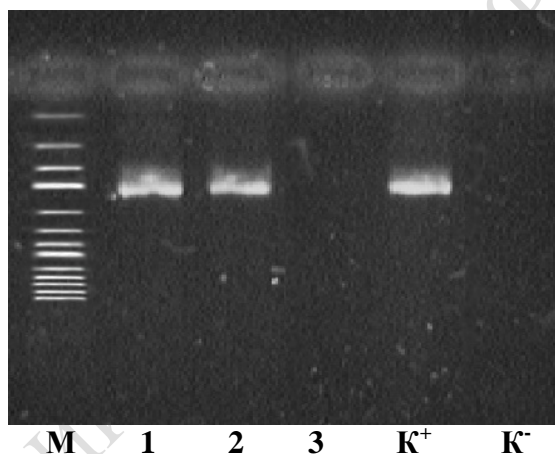
F: 5'-AGGAATTCCTGGTAAGTGCAAG-3' ;

R: 5'-CGTТАCTGAGGGAATCCTGGT-3'.

Затем провели апробацию праймеров, а также подобрали оптимальные условия для ПЦР-анализа представителей из рода *Diplostomum*.

Температура отжига является одним из ключевых параметров при проведении ПЦР-анализа, так как определяет условия для посадки праймеров на амплифицируемый участок. В серии проведенных экспериментов были апробированы различные температуры отжига (54, 56, 58 °С) и подобраны подходящие термопрофили, позволяющие амплифицировать фрагмент ДНК *Diplostomum spp.*, содержащий ITS1-5,8S-ITS2 участок и прилегающие к нему консервативные области 18S и 28S рибосомальных генов.

Используя полученные ампликоны подобрали условия для гель-электрофореза. Электрофоретическое фракционирование проводилось с использованием TBE буфера в 1,5 % агарозном геле в течение 60 минут при напряженности 85 В с последующей окраской бромистым этидием. Визуализацию ампликонов после электрофореза проводили с помощью облучения полученных агарозных гелевых пластин ультрафиолетом на транслюминаторе. Полученный электрофоретический спектр приведен на рисунке 1.



М – маркеры молекулярных масс; 1, 2, 3 – исследуемые образцы; K⁺ – положительный контроль; K⁻ – отрицательный контроль

Рисунок 1 – Электрофоретические спектры ITS1-5,8S-ITS2 *Diplostomum spp.*

Как видно из рисунка наиболее четкой и идентифицируемой является фракция 2 (t_a 56 °С), при температуре 58 °С не было получено достаточного количества ампликона для визуализации.

Результаты электрофореза фрагмента ДНК *Diplostomum spp.*, показали, что наиболее оптимальными для ПЦР-анализа зараженности диплостомидами вторых промежуточных хозяев – рыб семейства Сурпинidae оказались следующие термопрофили: 94 °С – 1 мин; 56 °С – 1 мин; 72 °С – 2 мин.

Работа проводилась в рамках тем ГПНИ 14-32 и ГПНИ 16-14, выполняемых в рамках Государственных программ «Фундаментальные основы биотехнологий» и «Биотехнологии».

Автор выражает благодарность научному руководителю члену-корреспонденту НАН Беларуси, д.б.н., профессору Г. Г. Гончаренко за всестороннюю помощь в проведении исследований и подготовке данной работы.

Литература

1 Шигин, А. А. Трематоды фауны России и сопредельных регионов. Род *Diplostomum*. Мариты / А. А. Шигин. – М.: Наука, 1993. – 208 с.

2 Molecular systematics of some North American species of *Diplostomum* (Digenea) based on rDNA-sequence data and comparisons with European congeners / D. E. Galazzo, S. Dayanandan, D. J. Marcogliese, J. D. McLaughlin // Canadian Journal of Zoology. – 2002. – Vol. 80(12). – P. 2207–2217.

УДК 630.28:582

Н. В. Ерошко

ОСОБЕННОСТИ ВЕГЕТАТИВНОГО РОСТА ОПЕНКА ЗИМНЕГО (*FLAMMULLINA VELUTIPES* (CURT.:FR.) SING.) В КУЛЬТУРЕ

Показаны особенности вегетативного роста и морфологии колоний съедобного базидиального гриба опенка зимнего в условиях культуры. Опенки зимний формировал на изучаемых питательных средах на седьмые сутки роста белые, плотные, бархатистые или пушистые колонии, диаметром 52,7–73,8 мм, высотой 1–2 мм.

Объемы промышленных заготовок дикорастущих грибов не могут удовлетворить растущий потребительский спрос населения на этот деликатесный продукт. После аварии на Чернобыльской АЭС на 1/3 площади, загрязненной радионуклидами, многие виды грибов вообще нельзя заготавливать. Учитывая биологическую способность некоторых видов активно накапливать в плодовых телах радионуклиды, тяжелые металлы, пестициды, потребление лесных грибов становится зачастую опасным для здоровья человека. Получение в достаточных количествах экологически чистой грибной продукции в Беларуси возможно только на основе промышленного культивирования грибов [1]. Перспективным грибом для получения плодовых тел в искусственных условиях является опенка зимний *Flammullina velutipes* (Curt.:Fr.) Sing. Целью наших исследований являлось изучение особенностей вегетативного роста опенка зимнего в культуре.

Плодовые тела опенка зимнего в природе отмечены нами в ноябре–декабре 2014 и 2015 гг. в городских посадках на иве ломкой и тополях. Шляпка зимнего опенка от 1 до 10 см в диаметре, плоскоокруглая, гладкая, голая, слизистая, во влажную погоду слабосклеивающаяся, желтая, желто-оранжевая или желто-коричневая с ржаво-коричневым центром, часто во влажную погоду край шляпки слегка прозрачен. В молодом возрасте край шляпки завернут внутрь, позже расправляется. Пластинки гриба слегка приросшие к ножке свободные, от кремовых, светло-желтых до светло-охряных. Мякоть шляпки желтоватая или кремовая, со свежим приятным грибным запахом. Ножка длинная, до 10 см, цилиндрическая, сверху иногда уплощенная, упругая, плотная, обычно центральная, с возрастом изогнутая, в верхней части светлая, желтоватая, в основании зрелых карпофоров темно-коричневая, бархатистая. Грибы в морозную погоду замерзают, становятся хрупкими, однако в оттепель, оттаивают и по нашим наблюдениям способны к дальнейшему росту.

По содержанию минеральных веществ и микроэлементов опенки зимний гриб превосходит многие продукты питания, его широко используют для получения лечебно-профилактических и лекарственных препаратов [2].

В исследованиях использовались культуры из рабочей коллекции культур высших грибов учреждения образования «Гомельский государственный университет им. Ф. Скорины». Опыты проводились в лаборатории кружка экспериментальной микологии СНИЛ «Леса Беларуси». Морфология колоний грибов и скорость вегетативного роста изучалась на агаризованных питательных средах на чашках Петри.