

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:

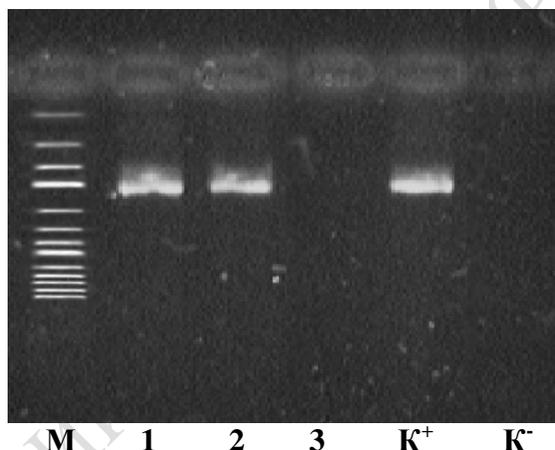
F: 5'-AGGAATTCCTGGTAAGTGCAAG-3';

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 трансиллюминаторе. Полученный электрофоретический спектр приведен на рисунке 1.



М – маркеры молекулярных масс; 1, 2, 3 – исследуемые образцы; K<sup>+</sup> – положительный контроль; K<sup>-</sup> – 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 опенки зимний *Flammullina velutipes* (Curt.:Fr.) Sing. Целью наших исследований являлось изучение особенностей вегетативного роста опенки зимнего в культуре.

Плодовые тела опенки зимнего в природе отмечены нами в ноябре–декабре 2014 и 2015 гг. в городских посадках на иве ломкой и тополях. Шляпка зимнего опенки 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.