

сорбируемости, связано с увеличением порядкового номера элемента, что в свою очередь коррелирует с увеличением ионного радиуса. Полученные результаты свидетельствуют о перспективности использования хитозан-глюканового комплекса выделенного из мицелия *A. niger* для переработки промышленных отходов с целью удаления опасных примесей и регенерации ценных металлов.

Список литературы:

1. Горовой, Л.Ф. Сорбционные свойства хитина и его производных. "Хитин и хитозан. Получение, свойства и применение"/ Л.Ф Горовой, В.Н. Косяков; под.ред. К.Г. Скрябина, Г.А. Вихоревой, В.П. Варламова. – М: Наука, 2002. – С. 217–246.
2. Хитозан / под.ред. К.Г. Скрябина, С.Н. Михайлова, В.П. Варламова. – М.: Центр "Биоинженерия" РАН, 2013. – 593 с.
3. Курченко В.П. Технологические основы получения хитина и хитозана из насекомых/ В.П. Курченко, С.В. Буга, Н.В. Петрашкевич, Т.В. Буткевич, А.А. Ветошкин, Е.Л. Демченков, А.Д. Лодыгин, О.Ю. Зуева, В.П. Варламов, О.И. Бородин // Труды БГУ. – 2016. – Т. 11, ч. 1. – С. 110 – 126.
4. Seeger R. // Dtsch. Lebensmittel-Rdsch. 1977. – V. 73, N 5. – P. 160–162.
5. Курченко В.П. Физико-химические свойства биологически активных соединений из подмора пчел (*Apis mellifera* L.) / В.П. Курченко, Т.В. Буткевич, Н.В. Пушкина, О.Ю. Зуева, В.П. Варламов, В.М. Завальнюк, О.И. Бородин, С.В. Буга// Природные ресурсы – 2016. –№ 2 – С. 1–6.
6. Muzzarelli R.A.A., Tanfani F., Scarpini G., et al. // J. Appl. Biochem. – 1980. – V. 2. N 1. – P. 54–59.
7. Muzzarelli, R.A.A. Chitin. – Oxford: Pergamon Press, 1977. – 305 p.
8. Masri M.S., Reuter F.W., Friedman M. // J. Appl. Polym. Sci. – 1974. – V. 18. – P. 675–681.
9. Koshijima Tetsuo, Tanaka Ryutaro, Muraki Einosuke et al. // Gellulose Chem. Technol. – 1973. – V. 7. – P. 197–208.

ДНК-ШТРИХКОДИРОВАНИЕ РЕЦЕНТНЫХ ВИДОВ ТЛЕЙ ФАУНЫ БЕЛАРУСИ

Воробьева М.М., Воронова Н.В., Буга С.В.
Белорусский государственный университет, г. Минск
masch.89@mail.ru

В результате выполненных исследований были расшифрованы и депонированы в GenBank нуклеотидные последовательности гена субъединицы 1 цитохромоксидазы с (COI) и гена субъединицы α фактора элонгации 1 (EF1 α) 15 видов тлей фауны Беларуси.

Введение. Тли (Sternorrhyncha: Aphidoidea) – таксон гемиптероидных насекомых (Insecta: Hemipteroidea), объединяющий в своем составе около 5000 рецентных видов, имеющих как локальное, так и субкосмополитное распространение [1]. Поскольку многие виды тлей принадлежат к числу вредителей и переносчиков вирусов сельскохозяйственных и иных культур, необходимо осуществлять постоянный мониторинг их состава и численности в культурфитоценозах.

К настоящему времени корректная видовая диагностика является одним из важнейших аспектов контроля численности и распространения насекомых-вредителей. Безусловно, определение по морфологическим ключам было и остается основным методом идентификации большинства видов насекомых, однако, в связи с наличием у тлей большого числа морфологически сходных видов и форм, применимость классических методов морфологической диагностики внутри этого таксона во многих случаях ограничена. В этой связи возникает необходимость в поиске новых методов и подходов, позволяющих решать такого рода задачи.

На сегодняшний день наиболее точным методом, позволяющим проводить корректную диагностику труднодифференцируемых видов и подвидов насекомых и, в частности, тлей, признана ДНК-идентификация. Наиболее известным и широко применяемым среди методов ДНК-идентификации видов является ДНК-штрихкодирование (ДНК-баркодирование), концепция которого основывается на том, что каждый биологический вид может быть идентифицирован на основе коротких стандартизированных фрагментов ДНК [2]. В результате длительных и многочисленных исследований у тлей, как и у всех животных, в качестве ДНК-штрихкода было принято использовать последовательность гена субъединицы 1 цитохромоксидазы *c* (COI) [3, 4].

К настоящему времени в научные исследования в области ДНК-штрихкодирования вовлечено более сотни научных центров из многих стран мира. Как известно, разработчиком концепции и крупнейшим мировым лидером в области ДНК-штрихкодирования живых организмов выступает Институт биоразнообразия в Онтарио (Канада). Международный консорциум по ДНК-штрихкодированию жизни, который был организован в 2007 г., к настоящему времени включает крупные научные центры из 28 стран [5]. На базе Института биоразнообразия в Онтарио была создана и постоянно пополняется Глобальная база данных ДНК-штрихкодов живых организмов (BOLD), содержащая нуклеотидные последовательности для более чем 250000 видов живых организмов из всех регионах мира. По последним данным в BOLD представлено 39824 расшифрованных нуклеотидных последовательностей для 1264 видов тлей, коллектированных в 54 странах, что составляет, к сожалению, только 24,3 % от общего количества описанных видов [6].

Поскольку ДНК-идентификация, основанная на ДНК-штрихкодировании, как это было сказано выше, представляет собой наиболее эффективный способ проведения исследований, связанных с установлением таксономической принадлежности, очевидна необходимость получения ДНК-штрихкодов для тлей, характеризующихся высокой степенью вредоносности и до сих пор не представленных в Международных генетических базах данных (BOLD, GenBank и др.). В этой связи в рамках настоящего исследования нами были расшифрованы и депонированы в GenBank нуклеотидные последовательности гена субъединицы 1 цитохромоксидазы *c* (COI) и гена субъединицы α фактора элонгации 1 (EF1 α) 15 видов тлей фауны Беларуси из числа вредителей сельскохозяйственных, лесных и декоративных культур, дополняющих ранее выполненные нами работы по ДНК-штрихкодированию животных организмов фауны Беларуси.

Методы исследования

Сбор энтомологического материала был выполнен на территории регионов Беларуси. Таксономическое положение охваченных исследованиями видов в соответствии с системой G. Remaudiere и M. Remaudiere [7] (для унификации с данными GenBank), представлено в таблице 1.

Таблица 1 – Таксономическое положение охваченных исследованиями видов тлей фауны Беларуси в соответствии с системой G. Remaudiere и M. Remaudiere [7]

Aphidinae	Macrosiphini	<i>Trichosiphonaphis corticis</i> (Aizenberg, 1935)
Aphidinae	Aphidini	<i>Aphis euphorbiae</i> Kaltenbach, 1843
Aphidinae	Aphidini	<i>Hyalopterus pruni</i> (Geoffroy, 1762)
Aphidinae	Aphidini	<i>Longicaudus thirhodus</i> (Walker, 1849)
Aphidinae	Macrosiphini	<i>Uroleucon hypochoeridis</i> (Fabricius, 1779)
Phyllaphidinae	Phyllaphidini	<i>Therioaphis tenera</i> Aizenberg, 1956
Calaphidinae	Calaphidini	<i>Monaphis antennata</i> (Kaltenbach, 1843)
Calaphidinae	Panaphidini	<i>Panaphis juglandis</i> (Goeze, 1778)
Chaitophorinae	Siphini	<i>Sipha maydis</i> Passerini, 1860
Chaitophorinae	Chaitophorini	<i>Periphyllus aceris</i> (Linnaeus, 1761)
Drepanosiphinae	Drepanosiphini	<i>Drepanosiphum platanoidis</i> (Schrank, 1801)
Cinarinae	Schizolachnini	<i>Schizolachmus pineti</i> (Fabricius, 1781)
Eriosomatinae	Eriosomatini	<i>Colopha compressa</i> (Koch, 1856)
Thelaxinae	Thelaxini	<i>Glyphina jacutensis</i> Mordvilko, 1931
Anoeciinae	Anoeciini	<i>Anoecia corni</i> (Hartig, 1841)

ДНК выделяли из единичных особей с использованием коммерческого набора DNA Purification Kit (Thermo scientific), внося необходимые изменения в протокол производителя. Для получения целевых фрагментов COI и EF1 α использовали праймеры, представленные в таблице 2.

Реакционная смесь для ПЦР содержала в 25 мкл: 3 мМ dNTP, 1 мМ каждого праймера, 2,5 мМ MgCl₂, 1×Taq Buffer, 1U Taq-полимеразы, 0,5 мкг ДНК-матрицы.

Таблица 2 – Праймеры, использованные для получения целевых фрагментов ДНК тлей

Ген	Праймер	Последовательность, 5'-3'	T _a °C	Размер получаемого фрагмента, п.н.
COI	HCO2198 LCO1490	TAAACTTCAGGGTGACCAAAAATCA GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG	50	708
EF1α	EF2 EF3	ATGTGAGCAGTGTGGCAATCCAA GAACGTGAACGTGGTATCAC	54	1100

Примечание: T_a – температура отжига праймера

ПЦР проводили с использованием амплификатора Agilent Technologies Sure Cycler 8800 в режимах: 94 °C – 3 мин; 35 циклов по 94 °C – 20 с, отжиг праймера – 40 с, 72 °C – 1 мин 30 с; 72 °C – 5 мин (при работе с праймерами LCO/HCO) и 94 °C – 3 мин; 35 циклов по 94 °C – 20 с, отжиг праймера – 30 с, 72 °C – 90 с; 75 °C – 5 мин (при работе с праймерами EF3/EF2).

Электрофорез фрагментов COI и EF1α проводили в 1,5 % агарозном геле в TAE-буфере и окрашивали 10000×ZUBRGreen-1 (Праймтех, Беларусь). Для оценки длин полученных фрагментов использовали маркер молекулярного веса MP1bp DNALadder (Thermo Scientific, Литва). Секвенирование ПЦР-продуктов выполнено компанией Macrogen (Нидерланды) с использованием праймеров LCO и EF3.

Множественное выравнивание нуклеотидных последовательностей провели по референсным генам модельного вида *Acyrtosiphon pisum* (Harris 1776) в программе MEGA8 с использованием алгоритма MUSCLE. Для визуализации последовательностей использовали программу BioEdit. Филогенетические деревья построены в системе BOLD с использованием приложения Identification. При этом помимо собственных сиквенсов использовали нуклеотидные последовательности, представленные в Международных генетических базах данных (информация об использованных последовательностях приведена на соответствующих рисунках).

Результаты и обсуждение

В Международных базах нуклеотидных последовательностей к настоящему времени содержатся записи, касающиеся 12 из 15 видов тлей, охваченных настоящим исследованием. В частности, наиболее хорошо представлены последовательности гена COI (таблица 3). Нуклеотидные последовательности остальных трех видов тлей, а именно *T. corticis* C. *compressa* и *G. jacutensis*, в генетических базах данных отсутствовали.

Таблица 3 – Представленность в Международных генетических базах данных нуклеотидных последовательностей генов COI и EF1 α тлей, вовлеченных в настоящее исследование

Вид тлей	Маркер	Количество сиквенсов в базах данных	Страна происхождения
<i>T. corticis</i>	COI	–	–
	EF1 α	–	–
<i>A. euphorbiae</i>	COI	1	Франция
	EF1 α	–	–
<i>H. pruni</i>	COI	61	Канада, Германия, Франция, США, Болгария, Китай, Индия, Пакистан, Греция, Великобритания, Южная Корея и Дания
	EF1 α	2	США, Корея
<i>L. thirhodus</i>	COI	8	Канада, Беларусь
	EF1 α	–	–
<i>U. hypochoeridis</i>	COI	17	Франция, Греция и Италия
	EF1 α	–	–
<i>A. corni</i>	COI	3	Нидерланды
	EF1 α	–	–
<i>M. antennata</i>	COI	2	Канада
	EF1 α	–	–
<i>S. maydis</i>	COI	27	США, Франция, Бразилия, Болгария
	EF1 α	1	Польша
<i>P. juglandis</i>	COI	5	Франция, Греция, США и Италия
	EF1 α	1	Испания
<i>P. aceris</i>	COI	2	Беларусь
	EF1 α	–	–
<i>D. platanoidis</i>	COI	213	Канада, Новая Зеландия, Беларусь, Норвегия и США
	EF1 α	–	–
<i>C. compressa</i>	COI	–	–
	EF1 α	–	–
<i>S. pineti</i>	COI	56	Канада, Норвегия, США, Гондурас
	EF1 α	–	–
<i>T. tenera</i>	COI	29	Беларусь и Канада
	EF1 α	–	–
<i>G. jacutensis</i>	COI	–	–
	EF1 α	–	–

Примечание: при отсутствии сиквенсов в Международных генетических базах данных в столбце ставили прочерк

В общей сложности нами было расшифровано 18 нуклеотидных последовательностей для 15 видов тлей. Для *C. compressa* ДНК-штрихкод был получен впервые в рамках настоящего исследования. Кроме того,

впервые были расшифрованы нуклеотидные последовательности гена EF1 α для 12 видов тлей (*T. corticis*, *A. euphorbiae*, *L. thirrhodus*, *U. hypochoeridis*, *A. corni*, *M. antennata*, *P. aceris*, *D. platanoidis*, *C. compressa*, *S. pineti*, *T. tenera* и *G. jacutensis*) фауны Беларуси.

При сравнительном анализе полученных нами нуклеотидных последовательностей гена EF1 α с последовательностями, представленными в Международных генетических базах данных другими исследователями, оказалось, что у тлей *H. pruni*, коллектированных в Беларуси и Корее [EU358930.1], отмечены замены в пяти сайтах (301A \leftrightarrow C, 304A \leftrightarrow T, 414G \leftrightarrow A, 681C \leftrightarrow T, 1040T \leftrightarrow C при определении позиции замены по полноразмерному гену), в то время как у тлей из Беларуси и США [DQ005160], а также из Кореи [EU358930.1], – в трех сайтах (414G \leftrightarrow A, 681C \leftrightarrow T, 1040T \leftrightarrow C) (рисунок 1). В результате сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей гена EF1 α тлей *S. maydis*, коллектированных в Европе и Беларуси, нуклеотидных замен отмечено не было.

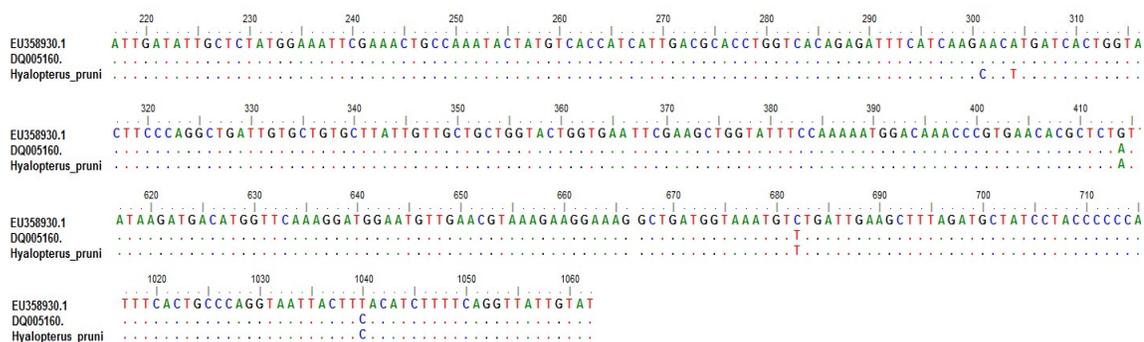


Рисунок 1 – Содержащий нуклеотидные замены участок последовательности EF1 α тлей *Hyalopterus pruni*, коллектированных в Корее, США и Беларуси

В рамках данной работы мы провели сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей гена COI образцов тлей *U. hypochoeridis*, коллектированных в географически удаленных регионах, – в частности было использовано 38 последовательностей из BOLD и 1 собственная последовательность, полученная для тлей данного вида. Для оценки сходства нуклеотидных последовательностей гена COI *U. hypochoeridis*, коллектированных на географически отдаленных территориях, построили дендрограмму (рисунок 2).

Всего у *U. hypochoeridis* было выявлено четыре гаплотипа COI. Эти гаплотипы не имели приуроченности к конкретной части ареала вида. У образцов тлей данного вида, коллектированных на территории Беларуси, был отмечен тот же гаплотип, что и у тлей из Италии и Франция, образовавших на филогенетическом дереве общий кластер (H3).

Аналогичным образом мы сравнили нуклеотидные последовательности гена COI тлей *P. juglandis* из географически удаленных регионов. Всего использовали 12 нуклеотидных последовательностей COI данного вида тлей (11 последовательностей из генетических баз данных, 1 – собственная).

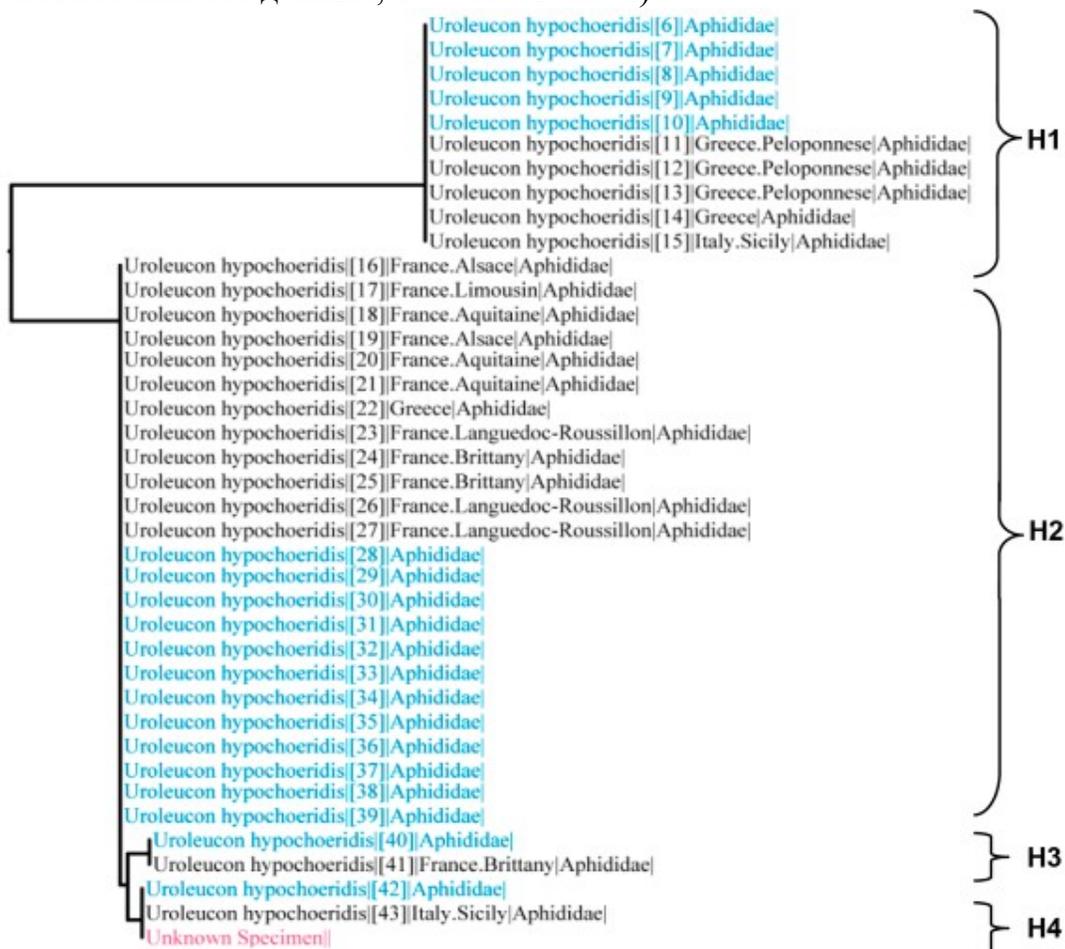


Рисунок 2 – Дендрограмма сходства нуклеотидных последовательностей COI тлей *Uroleucon hypochoeridis*, коллектированных на разных территориях

Для визуализации сходства нуклеотидных последовательностей гена COI *P. juglandis*, коллектированных на географически отдаленных территориях, построили дендрограмму (рисунок 3).

У тлей *P. juglandis* было выявлено три гаплотипа COI, причем у «белорусских» образцов был выявлен уникальный гаплотип (H3). Также как и у *U. hypochoeridis*, у тлей *P. juglandis* географической приуроченности конкретных гаплотипов не наблюдалось.

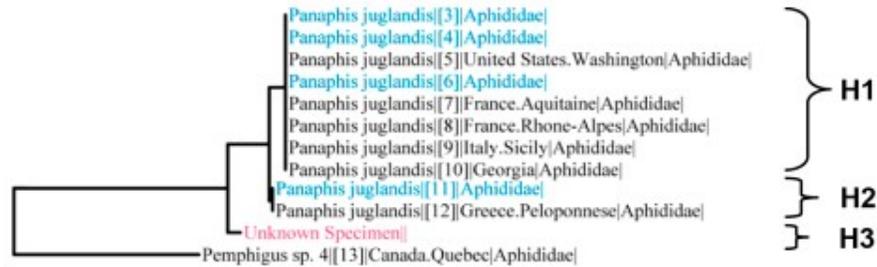


Рисунок 3 – Дендрограмма сходства нуклеотидных последовательностей COI тлей *Panaphis juglandis*, коллектированных на разных территориях

Выводы

Исходя из вышесказанного, можно заключить, что наполняемость Международных баз данных нуклеотидных последовательностей тлей недостаточна и требует доработки. В этой связи в рамках настоящего исследования нами впервые был получен ДНК-штрихкод для тлей *S. compressa*, а также расшифрованы нуклеотидные последовательности EF1 α 12 видов тлей фауны Беларуси, которые в настоящее время депонированы в GenBank и находятся в открытом доступе.

Исследования выполнены при частичной финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (проекты Б17МС-025, Б17-081).

Список литературы:

1. Aphids on the World's Plants: An online identification and information guide [Electronic resource] / Ed. R. Blackman. – London : Natural History Museum, 2012. – Mode of access: <http://www.aphidsonworldsplants.info>. – Date of access: 25.08.2017.
2. Biological identifications through DNA barcodes / P.D.N. Hebert [et al.] // Proc. R. Soc. Lond., B. Biol. Sci. – 2003. – Vol. 270. – P. 313–321.
3. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates / O. Folmer [et al.] // Mol. Mar. Biol. Biotechnol. – 1994. – Vol. 3, n. 5. – P. 294–299.
4. Voronova, N.V. Subspecies identification in aphids (Homoptera: Aphididae) by application of partial sequence of cytochrome c oxidase subunit I (COI) gene: a view on the potential of method / N.V. Voronova // American International Journal of Research in Formal, Applied & Natural Sciences. – 2014. – Vol. 6, n. 1. – P. 1–6.
5. Воронова, Н.В. Barcoding of life: Беларусь – участник глобальной инициативы по ДНК-штрихкодированию / Н.В. Воронова [и др.] // Труды БГУ. – 2014. – Т. 9, ч. 1. – С. 167–171.
6. BOLD Systems v4 [Электронный ресурс] / BOLD Systems v4. – Ontario, 2017. – Режим доступа:

http://www.barcodinglife.org/index.php/TaxBrowser_Home. – Дата доступа: 02.09.2017.

7. Remaudere, G. Catalogue of the world's Aphididae / G. Remaudiere, M. Remaudiere. – Paris: INRA, 1997. – 474 p.

СИНТЕЗ ХИТИНАЗ И ЦЕЛЛЮЛАЗ ГРИБАМИ РОДА *TRICHODERMA* –
ДЕСТРУКТОРАМИ РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ, ВЫДЕЛЕННЫМИ ИЗ
РАЗЛИЧНЫХ ИСТОЧНИКОВ

Галимзянова Н.Ф., Бойко Т.Ф., Кузьмина Л.Ю.,
Мелентьев А.И., Актуганов Г.Э.

Уфимский Институт биологии РАН, г. Уфа, gleakt@anrb.ru

Изучена хитинолитическая и целлюлозолитическая активность штаммов рода Trichoderma, выделенных из различных экосистем и характеризующихся способностью к эффективной деструкции труднорастворимых растительных остатков сплавины. При статическом глубинном культивировании индуцибельный синтез внеклеточных хитиназ наблюдался у штаммов T. koningii IB-9 и T. viride IB-33. В присутствии целлюлозы как единственного источника углерода в культуральной среде штаммов Trichoderma spp. IB-14 и IB-16, а также T. harzianum IB-15, наряду с 10-кратным увеличением продукции целлюлаз, отмечалось сопоставимое увеличение активности хитиназ. Способность к сравнительно высокой продукции внеклеточных целлюлаз/хитиназ, вероятно, обуславливает микопаразитические свойства и значительную антагонистическую активность некоторых исследованных штаммов, в частности, T. harzianum IB-15, что может быть использовано в разработке новых полифункциональных препаратов для защиты растений от фитопатогенов и биокомпостирования растительного сырья.

Грибы рода *Trichoderma* являются одной из наиболее распространенных и изучаемых групп почвенных микромицетов, широко представленных также в экосистемах ризосферы многих растений и в составе гниющих растительных остатков [1, 7]. Являясь сапротрофами, активно развивающимися на субстратах растительного происхождения, многие представители этого рода находят применение в процессах биоконверсии отходов растительного сырья, в том числе для биокомпостирования и получения кормовых добавок для животноводства, в производстве биотоплива [1]. Среди грибов рода *Trichoderma* известны оппортунистические, авирулентные растительные симбионты, а также микопаразиты и антагонисты многих фитопатогенных грибов [7]. Род *Trichoderma/Hypocrea* является наиболее изученной группой грибов, используемых для защиты растений; многие из них применяются в составе коммерческих препаратов, в т.ч. биопестицидов, биоудобрений и