

РЕСПУБЛИКАНСКОЕ УНИТАРНОЕ ПРЕДПРИЯТИЕ
«НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЦЕНТР
НАН БЕЛАРУСИ ПО ЗЕМЛЕДЕЛИЮ»

РЕСПУБЛИКАНСКОЕ НАУЧНОЕ ДОЧЕРНЕЕ
УНИТАРНОЕ ПРЕДПРИЯТИЕ
«ИНСТИТУТ ЗАЩИТЫ РАСТЕНИЙ»



ЗАЩИТА РАСТЕНИЙ

Сборник научных трудов

Основан в 1976 г.

Выпуск 42

Минск 2018

УДК 632 (476) (082)

В сборнике публикуются материалы научных исследований по видовому составу, биологии, экологии и вредоносности сорной растительности, насекомых и возбудителей заболеваний сельскохозяйственных культур. Представлены эффективность и экологическая безопасность агротехнических, биологических и химических мероприятий по оптимизации фитосанитарной ситуации агроценозов.

Для научных сотрудников, агрономов по защите растений, преподавателей, студентов сельскохозяйственных вузов.

Редакционная коллегия:

Л.И. Трепашко (главный редактор), С.В. Сорока (зам. главного редактора), С.Ф. Буга, Д.В. Войтка, А.А. Запрудский, С.И. Гриб, И.Г. Волчкевич, П.М. Кислушко, Э.И. Коломиец, В.С. Комардина, И.А. Прищепа, Л.И. Сорока, Л.В. Сорочинский, Р.В. Супранович, Э.И. Хотько, Е.А. Якимович, С.И. Ярчаковская, В.В. Головач (секретарь).

ISSN 0135-3705

© Республиканское унитарное предприятие
«Институт защиты растений», 2018

© Оформление ЧПТУП «Колорград», 2018

REPUBLICAN UNITARY ENTERPRISE «RESEARCH AND
PRACTICAL CENTER OF NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES
OF THE REPUBLIC OF BELARUS FOR ARABLE FARMING»

REPUBLICAN SCIENTIFIC SUBSIDIARY UNITARY ENTERPRISE
«THE INSTITUTE OF PLANT PROTECTION»



PLANT PROTECTION

Manual of Proceedings

Founded in 1976

Issue 42

Minsk 2018

Materials of scientific researches on specific composition, biology, ecology and weed plants harmfulness, insects and causal organisms of agricultural crop diseases are published in the collected articles. Effectiveness and ecological safety of agrotechnical, biological and chemical measures on optimization of phytosanitary agrocenosis situation is presented.

For scientific workers, agronomists in plant protection, lecturers and students of agricultural universities.

Editorial board:

L.I. Trepashko (chief editor), S.V. Soroka (deputy chief editor), S.F. Buga, D.V. Voitka, A.A. Zaprudskij, S.I. Grib, I.G. Volchkevich, P.M. Kislushko, E.I. Kolomiets, V.S. Kamardina, I.A. Prischepa, L.I. Soroka, L.V. Sorochinskij, R.V. Supranovich, E.I. Hotko, E.A. Yakimovich, S.I. Yarchakovskaya, V.V. Halavach (secretary).

М.М. Воробьева, Н.В. Воронова

Белорусский государственный университет, г. Минск

ИДЕНТИФИКАЦИЯ РЯДА ВИДОВ ТЛЕЙ ФАУНЫ БЕЛАРУСИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ДНК- ШТРИХКОДИРОВАНИЯ И ДОЧЕРНИХ МЕТОДОВ ДНК-ДИАГНОСТИКИ

Рецензент: канд. биол. наук Колтун Н.Е.

Аннотация. Расшифрована 21 нуклеотидная последовательность генов COI и EF1 α для 18 видов тлей рецентной фауны Беларуси. Расшифрованные нуклеотидные последовательности депонированы в GenBank (NSBI) и могут быть использованы в дальнейшем для идентификации энтомологических образцов методом ДНК-штрихкодирования. На основе ДНК-штрихкодов были разработаны ПДР-ПДРФ ключи, позволяющие проводить корректную видовую диагностику тлей рода *Dysaphis* Börn. и подвидов видов *Aphis fabae* Scop. и *Myzus cerasi* F. из числа вредителей семечковых, плодово-ягодных и иных возделываемых культур с исключением этапа секвенирования.

Ключевые слова: тли, идентификация видов, ДНК-штрихкодирование, ПЦР-ПДРФ анализ, рестрикционные карты.

Введение. Корректная идентификация таксономической принадлежности является одним из важнейших аспектов изучения биологического разнообразия, а также контроля численности и распространения насекомых-фитофагов, представляющих угрозу в качестве вредителей и переносчиков заболеваний культивируемых растений. Определение по морфологическим признакам остается одним из основных инструментов идентификации насекомых, однако, учитывая наличие среди тлей морфологически сходных видов и подвидов, их точное определение в ряде случаев представляет большую сложность [1].

В последние годы для идентификации трудно дифференцируемых видов и подвидов насекомых, в частности тлей, все чаще используется ДНК-идентификация, а именно, ДНК-штрихкодирование (ДНК-баркодинг) [2], в основе которого лежит представление о том, что каждый биологический вид может быть идентифицирован по короткому универсальному фрагменту ДНК. В результате длительных поисков такого фрагмента ДНК для животных в качестве ДНК-штрихкода было принято решение использовать митохондриальный ген субъединицы 1 цитохромоксидазы *c* (COI) [3].

К настоящему времени в научные исследования в области ДНК-штрихкодирования видов вовлечено более сотни научных

центров из 50 стран-участниц Международного консорциума по ДНК-штрихкодированию жизни (iBOL – International Consortium for the Barcode of Life). Разработчиком метода и мировым лидером в области ДНК-штрихкодирования является Институт Биоразнообразия в Онтарио, благодаря усилиям которого была создана Глобальная база данных ДНК-штрихкодов живых организмов (BOLD), которая активно пополняется в результате индивидуального и коллективного вклада ведущих исследователей в области систематики различных групп организмов [4]. На сегодняшний день в BOLD представлено 5 475 315 нуклеотидных последовательностей 220 931 видов насекомых, среди которых 39 824 последовательности расшифрованы для 1 264 видов тлей, в основном из числа вредителей сельскохозяйственных и иных возделываемых культур [5]. Расшифрованные и депонированные в Международные генетические базы данных нуклеотидные последовательности используются для идентификации энтомологических образцов как методом ДНК-штрихкодирования, так и любым другим методом ДНК-идентификации, основывающимся на использовании ДНК-штрихкода. В частности, ДНК-штрихкод может быть использован для разработки ПЦР-ПДРФ ключей и построения диагностических таблиц, причем, кроме ДНК-штрихкода в этих целях могут быть использованы и некоторые другие филогенетические маркеры, как, например, ядерный ген субъединицы α фактора элонгации 1 (EF1 α) [6].

Благодаря предыдущим исследованиям авторов данной работы и их коллег, на сегодняшний день расшифрованы и депонированы в BOLD и GenBank (NSBI) нуклеотидные последовательности 28 трудно дифференцируемых по морфологическим признакам видов тлей фауны Беларуси из числа опасных вредителей сельскохозяйственных и иных культивируемых растений [7]. Поскольку на территории Беларуси насчитывается более 130 видов тлей только из семейства *Aphididae*, среди которых около 50 видов принадлежат к числу вредителей ценных хозяйственных культур [8; 9], возникает необходимость в получении ДНК-штрихкодов, прежде всего, для тлей – вредителей культивируемых растений. Учитывая крайне недостаточную представленность в Международных базах данных последовательностей, полученных для образцов, коллектированных в Восточной Европе и, в частности, Беларуси, в рамках настоящего исследования мы дополнительно расшифровали последовательности генов COI и EF1 α и, на основе расшифрованных последовательностей гена COI, разработали ПЦР-ПДРФ ключи для идентификации трудно дифференцируемых по морфологическим признакам видов тлей рода *Dysaphis* Börn. (*Dysaphis anthrisci* Börn., *D. radicola* Mordv. и *D. plantaginea* Pass.), а также подвидов тлей видов *Aphis fabae* Scop. и *Myzus cerasi* Fabr.

Тли рода *Dysaphis*, а именно яблонно-подорожниковая тля (*D. plantaginea*) и яблонные красногалловые тли (*D. radicola* и *D. anthrisci*) принадлежат к числу вредителей семечковых плодово-ягодных культур [10]. Представители этого рода имеют двудомный жизненный цикл, в частности, *D. plantaginea* в начале июня совершает массовую миграцию с первичного кормового растения (*Malus* sp.) на вторичное (*Plantago* sp.) [11], *D. radicola* – с *Malus* sp. на *Rumex* sp. [12] и *D. anthrisci* – с *Malus* sp. на зонтичные растения (*Antpriscus silvestris* и *Chaerophyllum* sp.) [13]. Среди этих видов *D. plantaginea* представляет практический интерес, так как имеет высокую степень вредоносности в средневозрастных садовых насаждениях и, в соответствии с Постановлением Министерства сельского хозяйства и продовольствия Республики Беларусь № 29 от 17.10.2016 г., внесен в «Перечень особо опасных вредителей, болезней растений и сорняков» [14].

Свекловичная черная тля (*A. fabae*) и вишневая тля (*M. cerasi*) в условиях Беларуси формируют комплексы, в пределах которых выделяют формы с общим ареалом, но различным перечнем кормовых растений. У *A. fabae* на сегодняшний день выделяют четыре подвида, а именно, *A. fabae fabae* Scop., *A. fabae cirsiacanthoidis* Scop., *A. fabae mordvilko* Bötn. и *A. fabae solanella* Theob. В качестве первичного кормового растения *A. fabae fabae*, *A. fabae cirsiacanthoidis* и *A. fabae solanella* выступает *Euonymus europaeus* L., однако иногда эти тли могут использовать также *Viburnum opulus* L. Летом *A. fabae fabae* мигрирует на вторичные кормовые растения, в качестве которых выступает множество видов из семейств Leguminosae, Papaveraceae и Chenopodiaceae, в то время как летние поколения *A. fabae cirsiacanthoidis* развиваются только на *Cirsium* spp., а *A. fabae solanella* – на *Solanum nigrum* L., которые не входят в перечень кормовых растений *A. fabae fabae*. Первичным кормовым растением *A. fabae mordvilko* является *V. opulus* или *Philadelphus coronarius* L., а в качестве вторичных растений эти тли используют *Arctium* spp. L. и *Tropaeolum majus* L. [15; 16]. Поскольку свекловичная черная тля на территории Беларуси принадлежит к числу серьезных вредителей сельскохозяйственных культур, корректная идентификация подвигов тлей данного вида играет важную роль при контроле численности распространения фитофагов.

У *M. cerasi* выделяют два подвида, в частности, *M. cerasi cerasi* и *M. cerasi pruniavium*. В перечень первичных кормовых растений *M. cerasi cerasi* входит *Prunus cerasus* L. и *P. avium* L., а в перечень вторичных – травянистые растения родов *Galium*, *Euphrasia*, *Odontites* и *Veronica*. *M. cerasi pruniavium* ограничивается одним первичным кормовым растением (*P. avium*) на котором образует смешанные колонии с *M. cerasi cerasi*. Перечень вторичных кормовых растений *M. cerasi pruniavium* очень широк, в частности, включает виды растений,

принадлежавшие к следующим родам: *Plantago*, *Euphrasia* и *Galim* [17]. Необходимо отметить, что *M. cerasi cerasi* принадлежит к числу опасных вредителей молодых растений в вишневых насаждениях, в то время как *M. cerasi pruniavium* сильно повреждают как молодые, так и старшевозрастные экземпляры черешни. В последние годы прослеживается тенденция к снижению степени вредоносности тлей *M. cerasi cerasi* и, наоборот, повышению – тлей *M. cerasi pruniavium* [18], в связи с чем корректная видовая диагностика тлей подвидов тлей *M. cerasi cerasi* и *M. cerasi pruniavium* имеет огромное практическое значение для мониторинга их численности и распространения по территории Беларуси и сопредельных ей регионов, а также позволит рационализировать применяемые защитные мероприятия. Корректная диагностика упомянутых видов и подвидов тлей, как было показано выше, возможна только по вторичным кормовым растениям, в связи с чем возникает необходимость в привлечении новых методов и подходов для решения такого рода задач.

Место и методика проведения исследований. В работе использовали материал, коллектированный в Беларуси. Экстракцию ДНК выполняли с использованием набора DNA Purification Kit (Thermo scientific), внося необходимые изменения в протокол производителя. ПЦР проводили с использованием трех пар праймеров (табл. 1).

Таблица 1 – Праймеры, использованные для получения целевых фрагментов ДНК

Ген	Праймер	Последовательность, 5'–3'	T _{°C}	Размер получаемого фрагмента, п.н.
COI	LCO1490 HCO2198	GGTCAACAATCATAAAGATATTGG TAAACTTCAGGGTGACSAAAAAATCA	50	708
COI	LepF LepR	TAAACTTCTGGATGTCCAAAAAATCA ATTCAACCAATCATAAAGATATTGG	45	721
EF1 α	EF3 EF2	GAACGTGAACGTGGTATCAC ATGTGAGCAGTGTGGCAATCCAA	54	1100

Примечание: T_a – температура отжига праймера

Реакционная смесь для ПЦР содержала в 25 мкл: 3 мМ dNTP, 1 мМ каждого праймера, 2,5 мМ MgCl₂, 1×TaqBuffer (10 мМ Tris-HCl, 50 мМ KCl, 0,8% Nonidet P40), 1U Taq-полимеразы, 0,5 мкг ДНК-матрицы. 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; LepF/LepR) 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 EF1 α проводили в 1,5% агарозном геле в TAE-буфере (40 мМ Trisbase, 1 мМ

0,5 M EDTA, H₂O) и окрашивали 10000×ZUBRGreen-1 (Праймтех, Беларусь). Для оценки длин полученных фрагментов использовали маркер молекулярного веса MP1bp DNALadder (Thermo Scientific, Литва).

Секвенирование ПЦР-продуктов выполнялось компанией Macrogen (Нидерланды) с использованием праймеров LCO, LepR и EF3 для соответствующих ПЦР-продуктов. Кроме собственных расшифрованных последовательностей, использовали нуклеотидные последовательности гена COI, представленные в Международных генетических базах данных NCBI и BOLD. Всего было проанализировано 530 нуклеотидных последовательностей гена COI, среди которых 22 принадлежали *D. plantaginea* (Канада, Франция, Германия, США, Беларусь), 1 – *D. anthrisci* (Беларусь), 9 – *D. radicola* (Франция, Германия, Греция), 401 – *A. fabae* (Канада, Германия, Франция, США, Кения, Пакистан, Греция, Италия, Бразилия, Нидерланды, Великобритания, Болгария, Россия, Южная Корея, Беларусь) и 97 – *M. cerasi* (Канада, Франция, США, Германия, Австралия, Новая Зеландия, Австрия, Беларусь).

В программе MEGA7 провели множественное выравнивание нуклеотидных последовательностей генов COI для каждого вида тлей в отдельности. Число и дивергенцию гаплотипов рассчитали в программе DNAsp. Поиск сайтов рестрикции в нуклеотидных последовательностях осуществляли в программе BioEdit. Графические рестрикционные карты построили в программах CodonCodeAligner 4.2.7. или pDRAW32 1.1.112 с использованием всех известных ферментов рестрикции и их изоизомеров. По результатам анализа построенных рестрикционных карт создали ПЦР-ПДРФ таблицы. На основании разработанных ПЦР-ПДРФ таблиц были выбраны по два фермента для рестрикционного анализа каждой группы видов (подвидов), внутри которой требуется проводить дифференциацию, и проведена визуализация предполагаемых результатов рестрикции и электрофоретического разделения фрагментов методом *in silico*.

Для определения функциональных регионов (интронов и экзонов) фрагмента гена EF1 α , полученного для тлей фауны Беларуси, нуклеотидные последовательности выравнивали по мРНК EF1 α модельного вида тлей *A. pisum* [AK341330].

Результаты исследований. В рамках настоящего исследования расшифрована 21 нуклеотидная последовательность генов COI и EF1 α для 18 видов тлей рецентной фауны Беларуси. Расшифрованные нуклеотидные последовательности депонированы в GenBank (NSBI) и могут быть использованы в дальнейшем для идентификации энтомологических образцов методом ДНК-штрихкодирования. В табл. 2 представлены идентификационные номера для последовательностей генов COI и EF1 α тлей фауны Беларуси.

Таблица 2 – Коды доступа в GenBank для нуклеотидных последовательностей генов COI и EF1 α тлей фауны Беларуси, полученные в настоящем исследовании

Вид тлей	Код доступа в GenBank
Ген COI	
<i>A. fabae mordvilkoii</i>	MG027895
<i>A. pomi</i>	MG027896
<i>A. spiraeicola</i>	MG027897
<i>C. compressa</i>	MF377443
<i>P. juglandis</i>	MF377444
<i>U. hypochoeridis</i>	MF377446
Ген EF1 α	
<i>A. corni</i>	MG029630
<i>A. euphorbiae</i>	MG029635
<i>C. compressa</i>	MG020467
<i>D. platanoidis</i>	MG029631
<i>G. jacutensis</i>	MG020468
<i>H. pruni</i>	MG020469
<i>L. trirhodus</i>	MG020470
<i>M. antennata</i>	MG020471
<i>P. juglandis</i>	MG029636
<i>P. aceris</i>	MG029632
<i>S. pineti</i>	MG029633
<i>S. maydis</i>	MG029628
<i>T. tenera</i>	MG029634
<i>T. corticis</i>	MG029638
<i>U. hypochoeridis</i>	MG029629

Нуклеотидные последовательности анализируемого участка гена EF1 α у тлей, включенных в рамки данного исследования, имели различную структуру (табл. 3).

Среди исследованных тлей фауны Беларуси были выявлены виды, у которых структура гена EF1 α является типичной для тлей (*A. euphorbiae*, *T. tenera*, *D. platanoidis*, *P. juglandis*, *P. aceris*, *S. pineti*, *S. maydis*, *T. corticis*), а также виды, последовательность EF1 α которых не содержит интронов и представлена одним протяженным экзоном, соответствующим экзону 2 полноразмерного гена (*A. corni*, *C. compressa*, *G. jacutensis*, *H. pruni*, *L. trirhodus*, *M. antennata*, *U. hypochoeridis*). Такое существенное различие в структуре гена может значительно осложнять использование EF1 α в качестве молекулярного маркера при работе с тлями. В частности, использование одной и той же пары праймеров может приводить к получению чрезвычайно разнородных в функциональном отношении участков гена, что в итоге приведет к потере значительной потере

информации доступной для анализа. Этот факт стал одной из причин для рекомендации использования не EF1a, а баркод-региона для построения ПЦР-ПДРФ ключей и идентификации видов у тлей.

Таблица 3 – Интрон-экзонная структура анализируемого участка гена EF1a у некоторых видов тлей фауны Беларуси

Вид тлей	Интрон-экзонная структура участка гена EF1a					
	Длина фрагмента	Экзон 2	Интрон 2	Экзон 3	Интрон 3	Экзон 4
<i>A. corni</i>	471	с 1 по 471	–	–	–	–
<i>C. compressa</i>	499	с 1 по 499	–	–	–	–
<i>G. jacutensis</i>	766	с 1 по 766	–	–	–	–
<i>H. pruni</i>	831	с 1 по 831	–	–	–	–
<i>L. trirhodus</i>	786	с 1 по 786	–	–	–	–
<i>M. antennata</i>	778	с 1 по 778	–	–	–	–
<i>U. hypochoeridis</i>	778	с 1 по 778	–	–	–	–
<i>A. euphorbiae</i>	569	с 1 по 233	с 234 по 300	с 301 по 569	–	–
<i>T. tenera</i>	506	с 1 по 179	с 180 по 249	с 250 по 506	–	–
<i>D. platanooidis</i>	736	с 1 по 248	с 249 по 313	с 314 по 570	с 571 по 635	с 636 по 736
<i>P. juglandis</i>	910	с 1 по 246	с 247 по 312	с 313 по 571	с 572 по 631	с 632 по 910
<i>P. aceris</i>	872	с 1 по 237	с 238 по 305	с 306 по 566	с 567 по 671	с 672 по 872
<i>S. pineti</i>	779	с 1 по 237	с 238 по 305	с 306 по 561	с 562 по 630	с 631 по 779
<i>S. maydis</i>	789	с 1 по 237	с 238 по 315	с 316 по 574	с 575 по 679	с 680 по 789
<i>T. corticis</i>	918	с 1 по 242	с 243 по 314	с 315 по 573	с 574 по 634	с 635 по 918

Такого рода ключи были разработаны в рамках настоящего исследования для идентификации тлей рода *Dysaphis*, повреждающих яблони, в частности, *D. plantaginea*, *D. radicola* и *D. anthrisci*.

На основе анализа всех доступных нуклеотидных последовательностей гена COI рассчитали число гаплотипов для каждого вида тлей рода *Dysaphis* в отдельности. В доступных последовательностях (32 последовательностей) у *D. plantaginea* было выявлено 5 гаплотипов COI со средним значением дивергенции гаплотипов 0,325, а у *D. radicola* – 3 гаплотипа со средним значением дивергенции гаплотипов 0,556. С учетом всех выявленных гаплотипов провели сравнительный анализ рестрикционных карт, построенных отдельно для каждого вида тлей. В результате сравнительного анализа рестрикционных карт

анализируемых видов тлей, нами отобраны ферменты рестрикции для *D. plantaginea* (1 фермент) и для *D. radicola* (3 фермента), которые имели сайт узнавания в последовательности только одного из анализируемых видов тлей. Кроме того, выявлен один фермент рестрикции для *D. plantaginea* и *D. radicola*, который имел сайт узнавания в последовательностях этих видов тлей и не имел сайтов узнавания в последовательностях *D. anthrisci*.

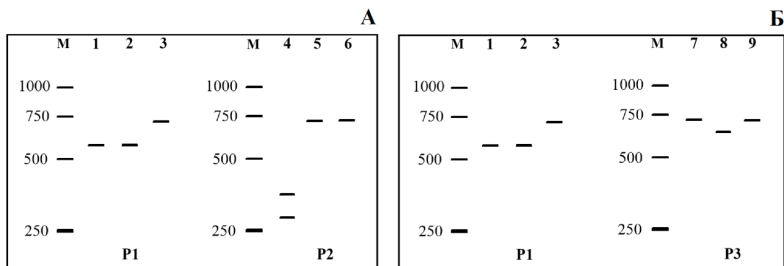
На основе полученных результатов созданы ПЦР-ПДРФ ключи, позволяющие проводить корректную диагностику рассматриваемых видов тлей рода *Dysaphis* (табл. 4).

Таблица 4 – ПЦР-ПДРФ ключи, позволяющие проводить корректную диагностику видов тлей рода *Dysaphis*, созданные на основе анализа нуклеотидных последовательностей фрагмента гена COI

Сайт узнавания Фермента	Подвид	Длины образующихся фрагментов
AlwI		
GGATCNNNN [^]	<i>D. plantaginea</i>	64+643
	<i>D. radicola</i>	64+643
	<i>D. anthrisci</i>	–
AciI		
C [^] CGC	<i>D. plantaginea</i>	292+415
	<i>D. radicola</i>	–
	<i>D. anthrisci</i>	–
MnII		
CCTCNNNNNN [^]	<i>D. plantaginea</i>	–
	<i>D. radicola</i>	626+81
	<i>D. anthrisci</i>	–
Tail		
ACGT [^]	<i>D. plantaginea</i>	–
	<i>D. radicola</i>	140+567
	<i>D. anthrisci</i>	–
TspGWI		
ACGGANNNNNNNNN [^]	<i>D. plantaginea</i>	–
	<i>D. radicola</i>	335+372
	<i>D. anthrisci</i>	–

Примечания: 1) «←» – сайт узнавания данной эндонуклеазы в последовательности отсутствует; 2) [^] – точка разрезания молекулы ДНК

Для оценки применимости подхода в реальных исследованиях мы провели визуализацию предполагаемых результатов рестрикции и электрофоретического разделения получаемых фрагментов методом *in silico* (рис. 1). Так, например, при совместном использовании эндонуклеаз AlwI и AciI, а также AlwI и MnII можно дифференцировать тлей *D. plantaginea* / *D. radicola* / *D. anthrisci*.



М – маркер молекулярного веса; 1, 4, 7 – *D. plantaginea*; 2, 5, 8 – *D. radicola*; 3, 6, 9 – *D. anthrisci*;
 А) P1 – рестриктаза AlwI; P2 – рестриктаза AclI; Б) P1 – рестриктаза AlwI; P3 – рестриктаза MnlI

Рисунок 1 – Компьютерное моделирование электрофоретического разделения фрагментов, получаемых в результате ПЦР-ПДРФ анализа тлей рода *Dysaphis* Börn.

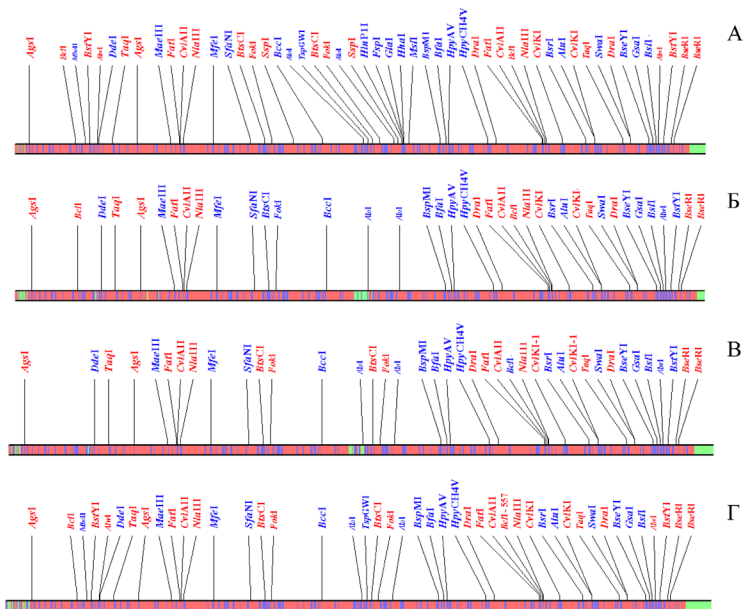
На основе имеющихся в доступе нуклеотидных последовательностей баркодинг-региона (401 последовательность) мы также разработали ПЦР-ПДРФ ключи для идентификации подвидов тлей вида *A. fabae*. Для этого рассчитали число гаплотипов COI для данного вида тлей (в частности, выявлено 20 гаплотипов со средним значением дивергенции между ними 0,596). С учетом всех выявленных гаплотипов провели сравнительный анализ рестрикционных карт, построенных отдельно для тлей *A. fabae fabae*, *A. fabae mordvilkoii*, *A. fabae solanella* и *A. fabae cirsiacanthoidis* (рис. 2).

Всего выявлено две эндонуклеазы, которые можно использовать для диагностики некоторых подвидов *A. fabae*.

В частности, рестриктаза HinP1I имеет сайт узнавания только в последовательности COI *A. fabae fabae*, а ParI – в последовательностях COI подвидов *A. fabae fabae*, *A. fabae cirsiacanthoidis* и *A. fabae mordvilkoii*, что позволило нам разработать ПЦР-ПДРФ ключи для идентификации подвидов тлей *A. fabae fabae* и *A. fabae solanella*, образующих смешанные колонии на бересклете европейском (*E. europaeus*) (табл. 5).

Для подвидов *A. fabae* провели компьютерное моделирование электрофоретического разделения фрагментов ПДРФ методом *in silico*. Например, при совместном использовании эндонуклеаз HinP1I и ParI (рис. 3) можно идентифицировать подвиды *A. fabae fabae*, *A. fabae cirsiacanthoidis* и *A. fabae solanella* или подвиды *A. fabae fabae*, *A. fabae mordvilkoii* и *A. fabae solanella*. Оказалось, что подвиды тлей *A. fabae cirsiacanthoidis* и *A. fabae mordvilkoii* невозможно идентифицировать методом ПЦР-ПДРФ анализа.

Аналогичным образом мы разработали ПЦР-ПДРФ ключи для диагностики трудно дифференцируемых на первичном кормовом растении подвидов тлей вида *M. cerasi*.



А) *A. fabae fabae*; Б) *A. fabae mordvilkoii*; В) *A. fabae solanella*; Г) *A. fabae cirsiacanthoidis*

Рисунок 2 – Рестрикционные карты, построенные на основе анализа нуклеотидных последовательностей баркодинг-региона, содержащие информацию о наличии сайтов узнавания для всех ферментов рестрикции, подвидов тлей *Aphis fabae*

Таблица 5 – ПЦР-ПДРФ ключи, позволяющие проводить корректную диагностику подвидов тлей вида *Aphis fabae*, созданные на основе анализа нуклеотидных последовательностей фрагмента гена COI

Сайт узнавания Фермента	Подвид	Длины образующихся фрагментов
HinPII		
G [^] ANTC	<i>A. fabae fabae</i>	313 + 395
	<i>A. fabae cirsiacanthoidis</i>	–
	<i>A. fabae mordvilkoii</i>	–
	<i>A. fabae solanella</i>	–
BcII		
T [^] GATCA	<i>A. fabae fabae</i>	55 + 653
	<i>A. fabae cirsiacanthoidis</i>	55 + 653
	<i>A. fabae mordvilkoii</i>	55 + 653
	<i>A. fabae solanella</i>	–

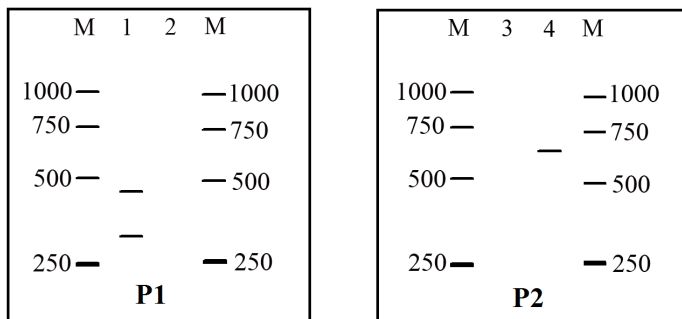
Примечание – 1) «-» – сайт узнавания данной эндонуклеазы в последовательности отсутствует; 2) ^ – точка разрезания молекулы ДНК

Таблица 6 – ПЦР-ПДФ ключи, позволяющие проводить корректную диагностику подвидов тлей вида *Myzus cerasi*, созданные на основе анализа нуклеотидных последовательностей фрагмента гена COI

Сайт узнавания фермента	Подвид	Длины образующихся фрагментов
HinfI		
G [^] ANTC	<i>M. cerasi cerasi</i>	85 + 623
	<i>M. cerasi pruniavium</i>	–
TfiI		
G [^] AWTC	<i>M. cerasi cerasi</i>	85 + 623
	<i>M. cerasi pruniavium</i>	–
AciI		
C [^] CGC	<i>M. cerasi cerasi</i>	–
	<i>M. cerasi pruniavium</i>	262 + 446
BstUI		
CG [^] CG	<i>M. cerasi cerasi</i>	–
	<i>M. cerasi pruniavium</i>	262 + 446
FauI		
CCC GCNNNN [^]	<i>M. cerasi cerasi</i>	–
	<i>M. cerasi pruniavium</i>	262 + 446

Примечания: 1) «[^]» – сайт узнавания данной эндонуклеазы в последовательности отсутствует; 2) [^] – точка разрезания молекулы ДНК

Для подвидов *M. cerasi cerasi* и *M. cerasi pruniavium* также провели визуализацию предполагаемых результатов рестрикции и электрофоретического разделения фрагментов методом *in silico*. Так, например, при совместном использовании некоторых эндонуклеаз, например, таких как AciI и TfiI (рис. 5) можно идентифицировать подвиды *M. cerasi pruniavium* и *M. cerasi cerasi*.



М – маркер молекулярного веса; 1, 3 – *M. cerasi pruniavium*; 2, 4 – *M. cerasi cerasi*; P1 – рестриктаза AciI; P2 – рестриктаза TfiI

Рисунок 5 – Компьютерное моделирование электрофоретического разделения фрагментов, получаемых в результате ПЦР-ПДФ анализа тлей *Myzus cerasi pruniavium* и *Myzus cerasi cerasi*

Заключение. Таким образом, в рамках настоящего исследования расшифрованы и депонированы в GenBank нуклеотидные последовательности генов COI и EF1 α для 18 видов тлей рецентной фауны Беларуси. Для 15 видов тлей нуклеотидные последовательности получены впервые, в частности, для тлей *C. compressa* – гена COI, а для тлей *A. corni*, *A. euphorbiae*, *C. compressa*, *D. platanoidis*, *G. jacutensis*, *L. trirhodus*, *M. antennata*, *P. aceris*, *S. pineti*, *T. tenera*, *T. corticis* и *U. hypochoeridis* – гена EF1 α .

На основе нуклеотидных последовательностей гена COI разработаны ПЦР-ПДРФ ключи, которые позволяют проводить корректную диагностику трудно дифференцируемых по морфологическим признакам видов тлей рода *Dysaphis* (*D. plantaginea* / *D. anthrisci* / *D. radicola*), а также подвидов *M. cerasi* и некоторых подвидов *A. fabae*.

Исследования выполнены при финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (договоры № Б17МС-025 и № Б17-081).

Авторы выражают огромную признательность доктору биологических наук, профессору, заведующему кафедрой зоологии С.В. Буге за предоставление биологического материала.

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: 18.03.2018.
2. DNA barcoding to improve the species-level management of wireworms (Coleoptera : Elateridae) / F.E. Etzler [et al.] // J. Economical Entomology. – 2014. – Vol. 107, №4. – P. 1476–1485.
3. Biological identifications through DNA barcodes / P.D.N. Hebert [et al.] // Proc. R. Soc. Lond. B. – 2003. – Vol. 270, Iss. 1512. – P. 313–321.
4. 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.
5. BOLD Systems v4 [Электронный ресурс] / BOLD Systems v4. – Ontario, 2017. – Режим доступа: http://www.barcodinglife.org/index.php/TaxBrowser_Home. – Дата доступа: 15.03.2018.
6. Воронова, Н.В. Разработка ПЦР-ПДРФ таблиц на основе последовательности гена *EF1a* для идентификации видов тлей – вредителей сельскохозяйственных растений / Н.В. Воронова, В.И. Головенчик // Молекулярная и прикладная генетика: сб. науч. тр. / Институт генетики и цитологии НАН Беларуси; редкол.: А.В. Кильчевский (гл. ред.) [и др.]. – Минск: Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, 2015. – Т.19. – С. 100–109.
7. Воронова, Н.В. Таксономический статус и молекулярно-видовая диагностика трудно дифференцируемых форм тлей фауны Беларуси (Rhynchota; Homoptera; Aphididae): автореф. дис. ...канд. биол. биол. наук: 03.01.07; 03. 02.05 / Н.В. Воронова; ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси». – Минск, 2012. – 22 с.
8. Буга, С.В. Дендрофильные тли Беларуси / С.В. Буга. – Минск: БГУ, 2001. – 98 с.
9. Buga, S. Aphids as pests of fruit- and berry-producing plants in Byelorussia / S. Buga, A.V. Stekolshchikov // Redia. – 2009. – Vol.92. – P. 239–242.

10. Плодовые культуры / Н.Е. Колтун [и др.] // Интегрированные системы защиты сельскохозяйственных культур от вредителей, болезней и сорняков. – Минск, 2005. – С. 371–417.
11. Evaluation of resistance in seven apple cultivars to rosy apple aphid, *Dysaphis plantaginea* (Hemiptera: Aphididae) under greenhouse and field conditions / J. Razmjou [et al.] // J. Crop Prot. – 2014. – Vol.3(2). – P. 173–180.
12. Lubiartz, M. The process of aphid egg-laying and the little known role of the Coccinellidae in aphid egg destruction in Poland – preliminary results / M. Lubiartz, E. Cichocka // Journal of Plant Protection Research. – 2014. – Vol. 54(3). – P. 242–249.
13. Rakauskas, R. Orchard aphids (Hemiptera: Sternorrhyncha, Aphidoidea) of Lithuania: a century of research / R. Rakauskas // Polish Journal of Entomology. – 2015. – Vol. 84. – P. 311–323.
14. Постановление Министерства сельского хозяйства и продовольствия Республики Беларусь № 29 от 17.10.2016 г. внесены в «Перечень особо опасных вредителей, болезней растений и сорняков» [Электронный ресурс] / Министерства сельского хозяйства и продовольствия Республики Беларусь. – Минск, 2016. – Режим доступа: http://www.ggiskzr.by/doc/.../osobo_opasnye_vred_17_10_16.doc/. – Дата доступа: 17.03.2018.
15. Thieme, T. Mate recognition in the *Aphis fabae* complex: daily rhythm of release and specificity of sex pheromones / T. Thieme, A.F.G. Dixon // Entomologia Experimentalis et Applicata. – 1996. – Vol. 79, Iss.1. – P. 85–89.
16. Raymond, B. On the processes shaping reproductive isolation in aphids of the *Aphis fabae* (Scop.) complex (Aphididae: Homoptera) / B. Raymond, J.B. Searle, A.E. Douglas // Biological Journal of the Linnean Society. – 2001. – Vol.74. – P. 205–215.
17. Mitochondrial COI and morphological evidence for host specificity of the black cherry aphids *Myzus cerasi* (Fabricius, 1775) collected from different cherry tree species in Europe (Hemiptera, Aphididae) / R. Rakauskas [et al.] // Zookeys. – 2014. – Vol.388. – P. 1–16.
18. Буга, С.В. Тли (Homoptera: Aphidinea) – вредители традиционных плодовых культур в условиях Беларуси: современное состояние и тенденции изменения состава и вредоносности / С.В. Буга, Н.В. Воронова, Ф.В. Сауткина // Плодоводство и ягодоводство России. – 2013. – № 36(1). – С. 64–69.

M.M. Varabyova, N.V. Voronova
Belorussian State University, Minsk, Belarus

IDENTIFICATION OF APHID SPECIES FROM BELARUS USING DNA-BARCODING AND ANOTHER DNA-BARCODING BASED DIAGNOSTIC METHOD

Annotation/ The nucleotide sequences of the mitochondrial cytochrome c oxidase I gene (COI) of aphid species of recent Belarusian fauna were sequenced. PCR-RFLP keys were created using the barcode region COI avoiding the DNA sequencing stage. The PCR-RFLP keys were designed for aphids of the genus *Dysaphis* Börn. and subspecies of the species *Aphis fabae* Scop. and *Myzus cerasi* F. which are pests of fruit, berries and other cultivated crops.

Key words: aphids, species identification, DNA-barcoding, PCR-RFLP keys, restriction map.

СОДЕРЖАНИЕ

Гербология

<i>Будревич А.П., Богомолова И.В.</i> Эффективность гербицида Клорит, ВР против осота желтого в посевах ярового рапса	11
<i>Гвоздов А.П., Булавин Л.А., Пынтиков С.А., Кранцевич В.Д., Белановская М.А., Ханкевич В.А., Синицкий В.П.</i> Влияние сроков внесения гербицидов на засоренность посевов и урожайность кукурузы	16
<i>Колесник С.А., Сташкевич А.В., Сорока Л.И., Сташкевич Н.С.</i> Засоренность и защита посевов кукурузы при возделывании в монокультуре и севообороте.....	23
<i>Пашкова И.Н.</i> Баковые смеси гербицидов в посевах капусты белокочанной, возделываемой по безрассадной технологии.....	32
<i>Серета Г.М.</i> Комбинированные гербициды почвенного действия в посадках картофеля	38
<i>Сташкевич А.В., Колесник С.А., Сорока С.В., Сташкевич Н.С.</i> Динамика засоренности посевов кукурузы в Беларуси перед уборкой.....	44
<i>Якимович Е.А.</i> Видовое разнообразие сорной растительности в посевах лекарственных растений	50
<i>Якимович Е.А.</i> Влияние сроков проведения ручной и химической прополки на качественные показатели сырья лекарственных растений	59

Фитопатология

<i>Вабищевич В.В.</i> Динамика развития аскохитоза и оценка эффективности фунгицидов для контроля болезни в посадках огурца защищенного грунта.....	74
<i>Жуковский А.Г., Крупенько Н.А., Буга С.Ф., Поплавская Н.Г., Жуковская А.А., Радивон В.А., Халаев А.Н., Жук Е.И., Радына А.А., Лешкевич В.Г., Бурнос Н.А., Крыжановская И.Н.</i> Корневая гниль зерновых культур и роль инфицированности семян в ее развитии.....	84
<i>Жуковский А.Г., Крупенько Н.А., Лешкевич В.Г., Бурнос Н.А., Жуковская А.А.</i> Распространенность и развитие снежной плесени в посевах озимых зерновых культур в Беларуси	96
<i>Комардина В.С., Васеха Е.В., Полексенова В.Д., Рубаник И.В.</i> Оценка чувствительности гриба <i>Alternaria</i> sp., возбудителя альтернариоза яблони к фунгицидам	103
<i>Крупенько Н.А.</i> Влияние гидротермических условий на развитие септориоза листьев озимой пшеницы.....	109
<i>Лешкевич Н.В.</i> Патогенный комплекс грибов, паразитирующих на озимом рапсе (литературный обзор).....	116

<i>Радивон В.А.</i> Видовой состав грибов-возбудителей корневой гнили ярового тритикале.....	135
<i>Радивон В.А., Жуковский А.Г.</i> Эффективность фунгицидов в защите ярового тритикале от болезней	141
<i>Свидуневич Н.Л.</i> Видовой состав грибов, паразитирующих на початках кукурузы в условиях Республики Беларусь	151
<i>Халаева В.И.</i> Влияние некорневых подкормок микроудобрением Кристаллон в системе защиты картофеля от болезней	158
<i>Ходенкова А.М.</i> Культурально-морфологические особенности развития грибов рода <i>Alternaria</i> – возбудителей альтернариоза подсолнечника масличного.....	165
<i>Юзефович Е.К., Войтка Д.В.</i> Контроль бактериальной инфекции тепличных культур экологически безопасными препаратами.....	171

Энтомология

<i>Бейтюк С.Н.</i> Прогноз заселённости посевов озимого рапса личинками капустного стручкового комарика в условиях западного региона Беларуси.....	180
<i>Бречко Е.В., Жукова М.И.</i> Тактика применения защитных мероприятий от вредных организмов в агроценозах картофеля при разном целевом использовании.....	191
<i>Быковская А.В., Самонов А.С.</i> Влияние гидротермических условий на ареал стеблевого кукурузного мотылька (<i>Ostrinia nubilalis</i> Hbn.) в Беларуси	201
<i>Воробьева М.М., Воронова Н.В.</i> Идентификация ряда видов тлей фауны Беларуси с использованием ДНК-штрихкодирования и дочерних методов ДНК-диагностики	209
<i>Гаджиева Г.И.</i> Регулирующая роль инсектицидов в ограничении численности и вредоносности свекловичной листовой тли.....	223
<i>Медведь Я.А., Федоренко В.П.</i> Особенности фенологии кокцинетелл в условиях лабораторной среды.....	231
<i>Мелюхина Г.В.</i> Динамика численности злаковых цикадок (Homoptera, Auchenorrhyncha) в зависимости от срока посева и нормы высева пшеницы озимой на протяжении всей вегетации в условиях лесостепи Украины.....	238
<i>Сауткин Ф.В., Буга С.В.</i> Структура комплекса вредителей бирючины в зелёных насаждениях Беларуси.....	249
<i>Трепашко Л.И., Бойко С.В.</i> Защита тритикале озимого от доминантных видов насекомых с учетом комплексных экономических порогов вредоносности.....	259

<i>Трешашко Л.И., Козич И.А., Василевская Л.П.</i> Экономическое обоснование применения препаратов разного направленного действия для защиты ячменя ярового от вредителей	274
---	-----

Общие вопросы защиты растений

<i>Бречко Е.В., Халаева В.И., Жукова М.И.</i> Тактические приемы защиты картофеля по предупреждению резистентности колорадского жука и фитофтороза к пестицидам	287
<i>Василенко Р.Н., Заець С.А.</i> Эффективность защиты сорго от болезней и вредителей на орошаемых и неполивных землях юга Украины	300
<i>Войтка Д.В., Янковская Е.Н., Радевич С.Ю., Гарко Л.С., Федорович М.В.</i> Совместимость химических и биологических средств защиты растений с энтомоакарифагом <i>Neoseiulus barkeri</i> Hughes.....	306
<i>Волчкевич И.Г., Попов Ф.А.</i> Эффективность приемов защиты посадок чеснока озимого от вредных организмов.....	316
<i>Волчкевич И.Г., Попов Ф.А., Пашкова И.Н.</i> Формирование ассортимента средств защиты растений на посевах моркови столовой.....	327
<i>Кислушко П.М.</i> Определение остаточных количеств ацетамиприда в растительном материале, почве и воде методом газожидкостной хроматографии.....	338
<i>Кислушко П.М., Быковский А.В., Кивачицкая М.М., Арашкович С.А., Поддубная А.О.</i> Остаточные количества пестицидов различных химических классов в растительной продукции	345
<i>Клечковский Ю. Э., Няццу Е.Ф.</i> Основные методологические аспекты процесса фумигации	352
<i>Ходенкова А.М., Белова Е.С.</i> Фитосанитарное состояние посевов подсолнечника масличного в Республике Беларусь	363
Авторский указатель.....	370

CONTENTS

Herbology

<i>Budrevich A.P., Bogomolova I.V.</i> Efficiency of the herbicide clorite, as against <i>sonchus arvensis</i> in spring rape crops	11
<i>Gvozдов A.P., Bulavin L.A., Pyntikov S.A., Krantsevich V.D., Belanovskaya M.A., Khankevich V.A., Sinitsky V.P.</i> Effect of herbicides and terms of their application on crop weediness and yield of maize	16
<i>Kolesnik S.A., Stashkevich A.V., Soroka L.I., Stashkevich N.S.</i> Weed infestation and corn crops protection by cultivation in monoculture and rotation	23
<i>Pashkova I.N.</i> Tank mixtures of herbicides in crops of cabbage cabbage, cultivated on nonseedlings technologies	32
<i>Sereda G.M.</i> Combined soil herbicides in potato plantings	38
<i>Stashkevich A.V., Kolesnik S.A., Soroka S.V., Stashkevich N.S.</i> Dynamics of corn crops weed infestation in Belarus before harvest	44
<i>Yakimovich E.A.</i> Specific diversity of weed vegetation in medical plant crops	50
<i>Yakimovich E.A.</i> Influence of hand weeding periods and herbicides on medicinal plants raw material quality	59

Phytopathology

<i>Vabishchevich V.V.</i> Dynamics of ascochyta leaf spot and evaluation of fungicides efficiency for the disease control in the protected ground cucumber plantings	74
<i>Zhukovsky A.G., Krupenko N.A., Buga S.F., Poplavskaya N.G., Zhukovskaya A.A., Radivon V.A., Khalaev A.N., Zhuk E.I., Radyna A.A., Leshkevich V.G., Burnos N.A., Kryzhanovskaya I.N.</i> Root rot of grain crops and seed affection role in its severity	84
<i>Zhukovsky A.G., Krupenko N.A., Leshkevich V.G., Burnos N.A., Zhukovskaya A.A.</i> Incidence and severity of snow mold in winter grain crops in Belarus	96
<i>Komardina V.S., Vasekha E.V., Polexonova V.D., Rubanik I.V.</i> Evaluation of fungus <i>alternaria</i> sp., an agent of apple <i>alternaria</i> blight to fungicides	103
<i>Krupenko N.A.</i> Influence of hydrothermal conditions on septoria leaf spot severity in winter wheat	109
<i>Lishkevich N.V.</i> The pathogenic complex of fungi parasitizing on winter rape ..	116
<i>Radivon V.A.</i> Specific composition of fungi-agents of spring triticale root rot	135
<i>Radivon V.A., Zhukovsky A.G.</i> fungicides efficacy for spring triticale protection against diseases	141
<i>Svidunovich N.L.</i> Specific composition of fungi parasitizing on corn cobs under conditions of the republic of Belarus	151

<i>Khalaeva V.I.</i> Influence of outside root micro fertilizer Crystalon application in the system of potato protection against the diseases.....	158
<i>Hodenkova A.M.</i> Cultural and morphological biological peculiarities of the genus <i>Alternaria</i> fungus (sunflower <i>alternaria</i> causative agents) development	165
<i>Yuzefovich A.K., Voitka D.V.</i> Control of greenhouse crops bacterial infection with environmentally safe preparations	171

Entomology

<i>Beitsiuk S.N.</i> Winter rape crops colonization by brassica pod gall midge under western region of Belarus conditions.....	180
<i>Brechko E.V., Zhukova M.I.</i> Tactics of protective measures application against harmful organisms in potato agrocoenoses under different target use	191
<i>Bykovskaya A.V., Samonov A.S.</i> Influence of hydothermal conditions on the european corn borer (<i>ostrinianubilalishbn.</i>) Area in Belarus	201
<i>Varabyova M.M., Voronova N.V.</i> Identification of aphid species from Belarus using dna-barcoding and another dna-barcoding based diagnostic method	209
<i>Hajyieva H.I.</i> Regulating role of insecticides in the decrease of beet aphid number and harmfulness	223
<i>Medved Ya. A., Fedorenko V.P.</i> Special features of the coccinellids phenology in the laboratory environment	231
<i>Meliukhina G.V.</i> Dynamics of cereal leafhoppers number (Homoptera, Auchenorrhyncha) depending on sowing time and winter wheat seeding rate during the whole vegetation in the conditions of the forest-steppe of Ukraine	238
<i>Sautkin F.V., Buga S.V.</i> Structure of the complex of phytophagous insects – pests of privets under the condition of green stands in Belarus.....	249
<i>Trepashko L.I., Boyko S.V.</i> Winter triticales protection against dominant insect species considering complex economic thresholds of harmfulness.....	259
<i>Trepashko L.I., Kozich I.A., Vasilevskaya L.P.</i> Economic substantiation of different directed action products use for the spring barley protection against pests	274

General issues of plant protection

<i>Brechko E.V., Khalaeva V.I., Zhukova M.I.</i> Tactical techniques of potato protection against colorado potato beetle and late blight resistance to pesticides.....	287
<i>Vasilenko R.N., Zaets S.A.</i> Efficiency of sorghum protection against diseases and pests on irrigated and non-irrigated soils of southern Ukraine.....	300
<i>Voitka D.V., Yankovskaya E.N., Radevich S.Yu., Garko L.S., Fedorovich M.V.</i> Compatibility of chemical and biological plant protection products with the entomoacariphage <i>Neoseiulus barkeri</i> Hughes.....	306
<i>Volchkevich I.G., Popov F.A.</i> Efficiency of winter garlic protection techniques against noxious organisms	316

<i>Volchkevich I.G., Popov F.A., Pashkova I.N.</i> Formation of plant protection products assortment on table carrot crops	327
<i>Kislushko P.M.</i> Acetamipride residues determination in the vegetative material, soil and water by gas liquid chromatography	338
<i>Kislushko P.M., Bykovsky A.V., Kivachitskaya M.M., Arashkevich S.A., Poddubnaya A.O.</i> Residues of different chemical class pesticides in agricultural plants.....	345
<i>Kletchkovsky J.E., Nyamezu E.F.</i> Main methodological aspects of fumigation process.....	352
<i>Hodenkova A.M., Belova E.S.</i> Phytosanitary state of sowings of sunflower oil in the republic of Belarus	363
Authors index.....	371