

Министерство образования Республики Беларусь
Учреждение образования
«Мозырский государственный педагогический университет
имени И. П. Шамякина»

Технолого-биологический факультет

ЭКОЛОГО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ СОСТОЯНИЯ И РАЗВИТИЯ ПОЛЕССКОГО РЕГИОНА

Материалы VII Международной заочной
научно-практической конференции
«Современные экологические проблемы развития
Полесского региона и сопредельных территорий:
наука, образование, культура»

Мозырь, 2016 г.

Под общей редакцией доктора биологических наук, профессора
В. В. Валетова

Мозырь
МГПУ им. И. П. Шамякина
2016

УДК 502
ББК 20.1
С56

Редакционная коллегия:

- Валетов В. В.,** ректор УО МГПУ, доктор биологических наук, профессор (общая редакция);
- Позывайло О. П.,** декан технолого-биологического факультета, кандидат ветеринарных наук, доцент (отв. ред.);
- Журлова И. В.,** заместитель декана по научной работе, кандидат педагогических наук, доцент;
- Котович И. В.,** заведующий кафедрой биолого-химического образования, кандидат биологических наук, доцент;
- Гуминская Е. Ю.,** заведующий кафедрой биологии и экологии, кандидат сельскохозяйственных наук, доцент.

Печатается согласно плану научно-практических мероприятий
Министерства образования Республики Беларусь
и приказу по университету № 1029 от 27.10.2016 г.

С56 **Эколого-биологические аспекты состояния и развития Полесского региона: материалы VII Междунар. заочн. науч.-практ. конф. «Современные экологические проблемы развития Полесского региона и сопредельных территорий: наука, образование, культура», Мозырь, 2016 г. / УО МГПУ им. И. П. Шамякина ; редкол.: О. П. Позывайло (отв. ред.) [и др.] ; под общ. ред. д-ра биол. наук, проф. В. В. Валетова. – Мозырь, 2016. – 180 с.**
ISBN 978-985-477-592-0.

В сборнике представлены исследования биологических и экологических аспектов состояния водных и наземных экосистем. Освещены подходы и технологии современного биологического и экологического образования.

Издание предназначено для научных сотрудников, преподавателей, аспирантов, магистрантов и студентов, специализирующихся в области биологии, экологии, медицины, сельского хозяйства.

Материалы публикуются в авторской редакции.

**УДК 502
ББК 20.1**

ISBN 978-985-477-592-0

© УО МГПУ им. И. П. Шамякина, 2016

ПРЕДВАРИТЕЛЬНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ КЛОНИРОВАНИЯ ГЕНА СУР6А13 ТЛЕЙ *MYZUS PERSICAE* (SULZER, 1776)

М. М. ВОРОБЬЕВА, Д. В. ГАЛИНОВСКИЙ, С. А. БЕЛАЯ, Н. В. ВОРОНОВА

Белорусский государственный университет, г. Минск,

e-mail: masch.89@mail.ru

Введение. Во всех регионах мира, в том числе в Беларуси, насекомые-фитофаги представляют серьезную угрозу для растений как возделываемых, так и свободно произрастающих. Особенно опасны в этом отношении насекомые, например, настоящие тли (Aphididae), выступающие переносчиками вирусов растений. Несмотря на то, что растения в процессе коэволюции с вредителями выработали целый ряд защитных приспособлений, их устойчивость не является абсолютной и может преодолеваться насекомыми. Некоторые виды тлей способны поражать большинство рецентных видов растений, включая токсичные, листья которых содержат алкалоиды и терпены, известные инсектицидными и репеллентными свойствами. Данная способность тлей проявляется в силу особенностей биологии тлей (телескопического партеногенеза и способности к анголоциклии) и характера питания (в первую очередь, флоэмососущих тлей).

Как известно [1], за нейтрализацию фитотоксинов, попадающих в организм насекомого в процессе питания соком растений, отвечают белки суперсемейства цитохромов р450 [2]. Количество генов СУР450, отвечающих за метаболизм ксенобиотиков, у насекомых может значительно варьировать: от 85 у тлей *Acyrtosiphon pisum* (Harris, 1776) до 114 – у *Myzus persicae* (Sulzer, 1776). Было показано, что у *M. persicae*, адаптированных к питанию на растениях табака,

наблюдается вторичная амплификация генов СУР6, проходящая без видимого метаболического ущерба [3]. Как полагают, эта особенность позволяет *M. persicae* питаться не менее чем на 1327 видах растений, принадлежащих к 109 различным семействам и отличающихся между собой содержанием и составом вторичных метаболитов [4]. Изучение 6-го семейства суперсемейства СУР450 и их белковых продуктов представляет актуальную задачу, поскольку данные ферменты отвечают как за метаболизм фитотоксинов, так и за нейтрализацию ксенобиотиков у тлей и могут обеспечивать устойчивость к ним.

Цель настоящего исследования – клонировать ген, ассоциированный с устойчивостью к инсектицидам у тлей *M. persicae*, а именно ген СУР6А13.

Материалы и методика исследований. В работе были использованы лабораторные линии тлей *M. persicae* с редьки черной (*Raphanus sativus* L., 1753), перца овощного (*Capsicum annuum* L., 1753) и моркови посевной (*Daucus carota* subsp. *sativus* (Hoffm.) Arcang, 1882).

Для выделения РНК использовали коммерческий набор «GeneJET RNA Purification Kit» (Thermo Scientific). Концентрацию препаратов РНК оценивали спектрофотометрически (Ultrospec 3300pp, Швеция). Синтез кДНК осуществили с использованием набора реагентов «Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit» (Thermo Scientific), используя в качестве матрицы РНК, предварительно очищенную от геномной ДНК. ПЦР провели с использованием собственных праймеров СУР6А13f7/СУР6А13r8 [5], позволяющих амплифицировать участок белок-кодирующей области гена СУР6А13 длиной 1132 п.н.

ПЦР проводили в реакционной смеси объемом 25 мкл следующего состава: 200 мкМ dNTP, 1 мкМ каждого праймера, 2,5 мкМ MgCl₂, 1×PCR Buffer, 1 ед. Taq-полимеразы и 0,5 мкг матрицы. ПЦР проводили в режиме: 94°C – 5 мин; 35 циклов по 94°C – 1 мин, 45°C – 1 мин, 72°C – 2 мин; 72°C – 10 мин. Электрофорез проводили в 1,5% агарозном геле. Для выделения из агарозного геля фрагмента ДНК нужной длины использовали набор «GeneJET Gel Extraction Kit» (Thermo Scientific). Концентрацию ПЦР-продуктов оценивали по интенсивности флуоресценции сравнением с маркерными фрагментами известной концентрации.

Для клонирования использовали набор «CloneJET PCR Cloning Kit» (Thermo Scientific), включающий плазмиду pJET1.2. Плазмиду, несущую интересующую вставку, вводили в клетки *E. coli* XL1-Blue по методике с использованием 0,1 М CaCl₂. Высев бактерий проводили на полноценную агаризованную LB-среду, содержащую ампициллин в концентрации 50 ед/мл. Полученные бактерии проверяли на наличие плазмиды со вставкой нужного размера методом ПЦР (можно подробнее, если место позволяет) и последующим электрофоретическим разделением ПЦР-продуктов в 1,5% агарозном геле. В качестве флуоресцентного красителя использовали ZUBR-Green (Праймтех, Беларусь), длину фрагментов определяли относительно маркера молекулярного веса 1kb DNA Ladder (Thermo Scientific).

Результаты исследований и их обсуждение. В работе выделили общую РНК из изолированных лабораторных линий тлей *M. persicae*, которых культивировали на разных кормовых растениях, отличающихся между собой содержанием токсичных вторичных метаболитов (перец овощной, морковь посевная и редька черная). На электрофореграмме (рисунок 1) представлены образцы РНК из перца овощного (лунки П1–4), моркови посевной (П5–6 лунки) и редьки черной (П7–8 лунки). В таблице представлены результаты измерения оптической плотности и концентрации РНК данных образцов.

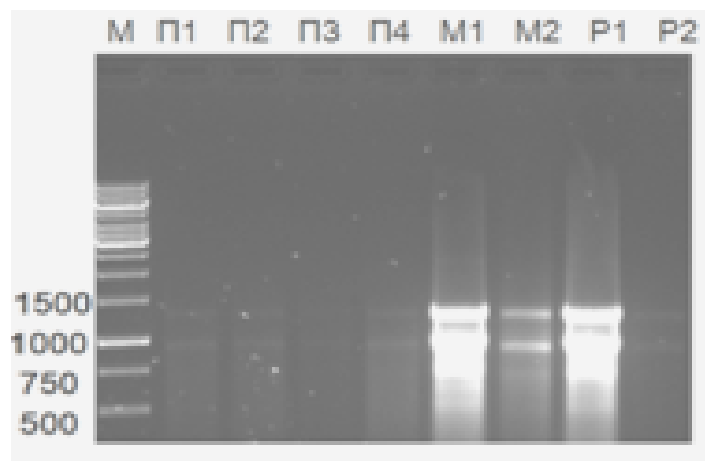


Рисунок 1 – Электрофореграмма препаратов РНК, выделенной из тлей *M. persicae*

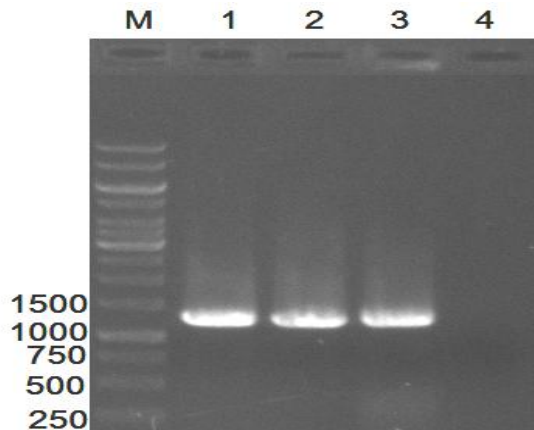
Образцы П3 и P2 имели низкую концентрацию РНК, поэтому были исключены из дальнейшей работы. На основе оставшихся образцов РНК синтезировали кДНК. Для синтеза брали аликвоту, содержащую 0,5 мкг РНК, очищенной от геномной ДНК. Далее полученную к ДНК использовали в качестве матрицы для синтез фрагмента гена Таблица – Характеристика препаратов РНК, выделенных из тлей *M. Persicae* (или полноразмерного гена) *СУР6A13*. В результате амплификации были получены ПЦР-

№	Кормовое растение	λ 260	λ 280	λ 320	Концентрация РНК мкг/мл
П1	Перец овощной	0,059	0,035	0,08	32,5
П2	Перец овощной	0,107	0,060	0,012	60,5
П3	Перец овощной	0,048	0,032	0,015	23,0
П4	Перец овощной	0,100	0,058	0,014	55,0
M1	Морковь посевная	1,506	0,838	0,015	954
M2	Морковь посевная	0,263	0,150	0,013	159,5
P1	Редька черная	2,118	1,167	0,016	1345
P2	Редька черная	0,044	0,031	0,018	16,5

продукты ожидаемой длины для линии тлей, с каждой культуры. Для очистки целевых фрагментов ДНК от неспецифических продуктов амплификации, ПЦР-продукт размером около 1,1 т.п.н. экстрагировали из геля. Концентрацию фрагментов нужного размера оценили по интенсивности флуоресценции: в образцах с редьки черной и моркови посевной она составила 10 нг/мкл, с перца овощного – 9 нг/мкл.

Перед лигированием ПЦР продукта с плазмидой провели ферментативную реакцию отщепления концевого неспецифического нуклеотида, который присоединяется ферментом *Taq*-полимеразой в процессе синтеза ПЦР-продукта. Фрагменты кодирующей области гена *СУР6A13* из тлей, собранных с моркови, клонировали в вектор pJET1.2 (полученная плазида обозначена pJET-6) в клетки бактерий *E. coli* XL1-Blue. Для тлей с других растений клонировать фрагмент не удалось.

Для подтверждения размера вставки в составе полученной плазмиды проводили ПЦР с плазмидой pJET-6 в качестве матрицы и праймерами к полилинкеру данной плазмиды. На электрофореграмме (рисунок 2) виден фрагмент нужного размера, полученного из тлей, собранных с моркови посевной.



1, 2 – вставка размером 1132 п.н.; 3 – положительный контроль (содержит вставку контрольного фрагмента); 4 – отрицательный контроль (не содержит матрицы)

Рисунок 2. – Электрофореграмма продуктов ПЦР клонированного фрагмента

Заключение. Ген CYP6A13 тлей *M. persicae* был успешно клонирован с использованием праймеров CYP6A13f7/ CYP6A13r8 для получения целевого фрагмента длиной 1132 п. н.

Литература

1. Feyereisen, R. Insect CYP Genes and P450 Enzymes / R. Feyereisen // Insect molecular biology and biochemistry / ed. L. I. Gilbert. – Elsevier, 2012, Ch. 8. – P. 236–295.
2. Despres, L. The evolutionary ecology of insect resistance to plant chemicals / L.Despres, J. P.David, C. Gallet // Trends in Ecology and Evolution. – 2017. – Vol. 22, Iss. 6. – P. 298–307.
3. Comparative analysis of detoxification enzymes in *Acyrtosiphon pisum* and *Myzus persicae*/ J. S. Ramsey [et al.] // Insect Mol. Biol. – 2010. – Vol.19. – P. 155–164.
4. Holman, J. Host plant catalog of aphids. Palaearctic region / J. Holman // Berlin: Springer Science, 2009, Germany, – 1216 pp.
5. Белая, С. А. Разработка праймеров для амплификации генов 4 и 6 семейств цитохромов р450 тлей (Hemiptera: Rhinchotha: Aphidoidea) / С. А. Белая // Научные стремления: материалы V Междунар. науч.-практ. конф. – 2014. – Минск, 2014. – С. 17–20.

ЛУКАШ А. В., БУЗУНКО П. А., ЛЕВЧЕНКО И. К. ОПТИМИЗАЦИЯ ТЕРРИТОРИАЛЬНОЙ ОХРАНЫ ФИТОРАЗНООБРАЗИЯ ЩОРСКО-СЕМЕНОВСКОГО ГЕОБОТАНИЧЕСКОГО РАЙОНА (ВОСТОЧНОЕ ПОЛЕСЬЕ) В СВЯЗИ С НОВЫМИ ФЛОРИСТИЧЕСКИМИ НАХОДКАМИ.....	77
МЕДВЕДЕВА А. В. ПОВЕДЕНЧЕСКИЙ РЕПЕРТУАР ЗЕЛЕННОЙ ИГУАНЫ (<i>IGUANA IGUANA</i>) В УСЛОВИЯХ ИСКУССТВЕННОГО СОДЕРЖАНИЯ	80
ОСТРИКОВА М. Я., АЛЕЩЕНКОВА З. М., САФРОНОВА Г. В., КУЛАГИН Д. В., КОНСТАНТИНОВ А. В. ИСПЫТАНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ДЕЙСТВИЯ МИКРОБНОГО ПРЕПАРАТА БАКТОПИН (ТОРФЯНОЙ) НА РОСТ И РАЗВИТИЕ СЕЯНЦЕВ СОСНЫ ОБЫКНОВЕННОЙ И ЕЛИ ЕВРОПЕЙСКОЙ	82
ОСТРОВСКИЙ А. М. НОВЫЕ НАХОДКИ РЕДКИХ И ОХРАНЯЕМЫХ ВИДОВ НАСЕКОМЫХ НА ТЕРРИТОРИИ ГОМЕЛЬСКОЙ ОБЛАСТИ	84
ПОТОЦКАЯ С. А. НАПРАВЛЕНИЯ ОПТИМИЗАЦИИ ОЗЕЛЕНЕНИЯ УРБОТЕРРИТОРИЙ ПРИБРЕЖНОЙ ЧАСТИ МАЛЫХ РЕК ЛЕВОБЕРЕЖНОГО ПОЛЕСЬЯ (НА ПРИМЕРЕ РЕКИ СТРИЖЕНЬ ГОРОДА ЧЕРНИГОВА)	88
СЕДЛОВСКАЯ С. М. АНТИФИДАНТНАЯ АКТИВНОСТЬ АГОНИСТА ЭКДИСТЕРОИДОВ R-211 ПРИ КОНТАКТНО-КИШЕЧНОМ ВОЗДЕЙСТВИИ НА ГУСЕНИЦ КИТАЙСКОГО ДУБОВОГО ШЕЛКОПРЯДА (<i>Antheraea pernyi G.-M.</i>)	91
СМОЛЯР Н. А., СМАГЛЮК Е. Ю. СОХРАНЕНИЕ И ОХРАНА ЛЕСНОЙ РАСТИТЕЛЬНОСТИ В БАССЕЙНЕ НИЖНЕЙ СУЛЫ (УКРАИНА)	93
СОКОЛОВ А. С., СИВАКОВА Т. А. СПОСОБЫ КАРТОГРАФИРОВАНИЯ ЛАНДШАФТНОГО РАЗНООБРАЗИЯ БЕЛАРУСИ	97
СОКОЛОВ А. С. ЛАНДШАФТНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ТЕРРИТОРИЙ С РАЗЛИЧНОЙ СТЕПЕНЬЮ АНТРОПОГЕННОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ	100
СТОРОЖИШИНА К. М., РЕШЕТНИКОВ В. Ф. ДИНАМИКА СОСТАВА НАСАЖДЕНИЙ ДУБА ЧЕРЕШЧАТОГО В ЛЕСАХ МОЗЫРЩИНЫ	103
ХУТ К. М., СЕЛЕВИЧ Т. А. СОСУДИСТЫЕ РАСТЕНИЯ ВОДОХРАНИЛИЩА ВОЛПА (ВОЛКОВЫССКИЙ РАЙОН, ГРОДНЕНСКАЯ ОБЛАСТЬ)	105

СЕКЦИЯ № 3

БИОХИМИЯ, ФИЗИОЛОГИЯ И БИОТЕХНОЛОГИЯ

ВАЛЕТОВ В. В., ДЕГТЯРЕВА Е. И. ВЛИЯНИЕ РАДИОАКТИВНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ НА ПОКАЗАТЕЛИ КРОВИ ЛЮДЕЙ	109
ВЕТОШКИН А. А., БУТКЕВИЧ Т. В. ПОЛУЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ ИЗ КУТИКУЛЫ МАДАГАСКАРСКОГО ШИПЯЩЕГО ТАРАКАНА (<i>GROMPHADORINA GRANDIDIERI</i>)	112
ВОРОБЬЕВА М. М., ГАЛИНОВСКИЙ Д. В., БЕЛАЯ С. А., ВОРОНОВА Н. В. ПРЕДВАРИТЕЛЬНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ КЛОНИРОВАНИЯ ГЕНА СУР6A13 ТЛЕЙ <i>MYZUS PERSICAE</i> (SULZER, 1776)	114
ДЕГТЯРЕВА Е. И., АТАНАСОВА Ю. В. АНТИМИКРОБНАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ ЭФИРНЫХ МАСЕЛ В ОТНОШЕНИИ УСЛОВНО-ПАТОГЕННОЙ МИКРОФЛОРЫ	117
ДЕНИСОВА С. И. ОСОБЕННОСТИ РАЗВИТИЯ ОЛИГО- И ПОЛИТРОФНЫХ ЧЕШУЕКРЫЛЫХ ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ БИОПРЕПАРАТОВ.....	120
КРИКАЛО И. Н., ХАМЛЮК Е. Е. ВЫЯВЛЕНИЕ У ШКОЛЬНИКОВ УРОВНЯ РИСКА РАЗВИТИЯ КОМПЬЮТЕРНОЙ ЗАВИСИМОСТИ	123