

ДНК-ШТРИХКОДИРОВАНИЕ – СОВРЕМЕННЫЙ МЕТОД ИССЛЕДОВАНИЯ В ЭНТОМОЛОГИИ

М.М. Воробьёва

Полесский государственный университет, vorobjeva.m@polessu.by

Аннотация. Расшифрованы нуклеотидные последовательности COI для 36 видов тлей фауны Беларуси. ДНК-штрикоды хранятся в открытом доступе и могут быть использованы для идентификации методом ДНК-штрихкодирования, изучения генетического полиморфизма и филогенетического анализа.

Ключевые слова: ДНК-штрихкодирование, тли, митохондриальный ген субъединицы 1 цитохромоксидазы *c* (COI), ген субъединица *a* фактора элонгации 1 (EF1 α), BOLD, GenBank.

ДНК-штрихкодирование – современный метод, позволяющий идентифицировать виды на основе отдельных фрагментов организма, его биологических жидкостей, а также стадий жизненного цикла с недостаточным количеством морфологических признаков. В основе концепции ДНК-штрихкодирования лежит представление о том, что каждый биологический вид должен быть идентифицирован по короткому и универсальному участку ДНК: для животных таким участком является митохондриальный ген субъединицы 1 цитохромоксидазы *c* (COI), для растений – пластидные гены рибулозобисфосфаткарбоксылазы (*rbcL*) и матуразы *K* (*matK*), для грибов – внутренние транскрибируемые спейсеры ядерных генов рибосомальных РНК (ITS), а для прокариот – ген рРНК субъединицы рибосомы с коэффициентом седиментации 16 (16S rRNA) [1].

Ценность данного подхода, позволяющего осуществлять корректную видовую идентификацию, очевидна как с фундаментальной, так и с практической точки зрения. В настоящее время ДНК-штрихкодирование нашло применение в области биологического разнообразия, защиты исчезающих видов, для предотвращения негативных последствий и экономических потерь при биотехнологическом производстве, а также карантинными, мониторинговыми и таможенными службами, криминалистами и эпидемиологами для решения собственных прикладных задач [2].

Для систематизации, хранения и анализа данных, получаемых при изучении различных таксонов, созданы Международные генетические базы данных – BOLD и GenBank, которые активно пополняются, благодаря добровольным усилиям международного научного сообщества [3, 4]. Необходимо подчеркнуть, что в последние годы работы по ДНК-штрихкодированию представителей флоры и фауны Беларуси с успехом осуществляются в Белорусском государственном университете, Институте генетики и цитологии НАН Беларуси и других научных центрах.

С положительной стороны зарекомендовал себя метод ДНК-штрихкодирования как инструмент биомониторинга. Глобализация торговли, развитие транспорта и изменение климата привели к росту количества инвазивных видов, в том числе насекомых, угрожающих сельскому и лесному хозяйству. Использование ДНК-штрихкодов предоставляет возможность быстро выявлять эти виды, предотвращать их распространение и сокращать затраты на борьбу с ними. Кроме того, ДНК-штрихкодирование позволяет улучшить существующие стратегии контроля численности вредителей и переносчиков заболеваний. В связи с вышесказанным возникает необходимость в получении ДНК-паспортов (ДНК-штрикодов) насекомых из числа вредителей сельскохозяйственных и иных возделываемых культур и депонировании их в Международные генетические базы данных нуклеотидных последовательностей, ввиду их недостаточной представленности.

В качестве объекта исследования определены аборигенные и инвазивные виды тлей – вредители сельскохозяйственных и иных возделываемых культур. Сбор материала осуществлялся на территории Беларуси д.б.н., профессором С.В. Бугой, к.б.н., доцентом Д.Г. Жоровым, ст. преподавателем О.В. Синчуком, лично автором, а также аспирантами кафедры зоологии БГУ (рисунок).

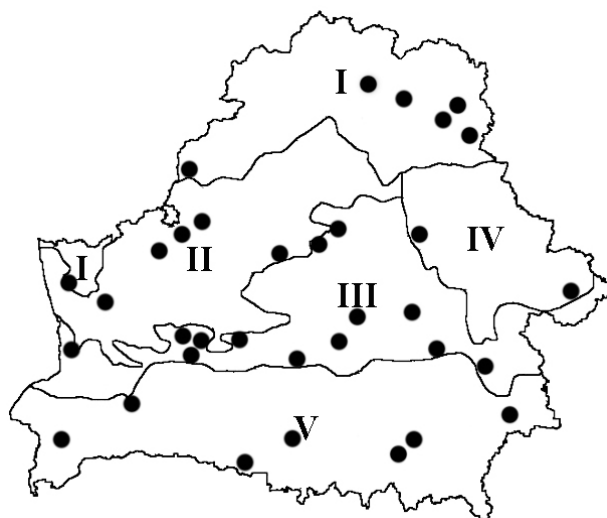


Рисунок – Карта сбора энтомологического материала

на территории Беларуси: I – Поозерская провинция; II – Восточно-Белорусская провинция; III – Западно-Белорусская провинция; IV – Предполесская провинция; V – Полесская провинция

Образцы помещались в 96% этанол и хранились при $-24\text{ }^{\circ}\text{C}$. Для выделения ДНК использовался коммерческий набор с внесением изменений в протоколы производителей (методика была адаптирована для работы с единичными образцами). ПЦР проводили с использованием геноспецифичных праймеров [4,5]. Секвенирование ПЦР-продуктов выполнялось компанией Macrogen (Нидерланды), Центром ДНК-штрихкодирования Института Биоразнообразия Онтарио при университете Гуэлфа (Канада).

В результате работы расшифрованы нуклеотидные последовательности COI и EF1 α для 36 видов тлей фауны Беларуси (таблица).

Таблица – Коды доступа в BOLD и GenBank для нуклеотидных последовательностей гена COI и EF1 α тлей

Вид	Код доступа	Длина последовательности
1	2	3
BOLD		
<i>Amphorophora idaei</i>	TLAPH045-15	633
<i>Anuraphis subterranea</i>	TLAPH026-15	554
<i>Aphis craccivora</i>	TLAPH007-15	601
<i>Aphis euphorbiae</i>	TLAPH065-15	625
<i>Aphis fabae cirsiacanthoidis</i>	TLAPH020-15	588
<i>Aphis fabae fabae</i>	TLAPH015-15	634
<i>Aphis podagrariae</i>	TLAPH060-15	597
<i>Aulacorthum solani</i>	TLAPH049-15	588
<i>Brachycaudus divaricatae</i>	TLAPH001-15	492
<i>Delphiniobium junackianum</i>	TLAPH063-15	619
<i>Dysaphis lauberti</i>	TLAPH027-15	627
<i>Longicaudus trirhodus</i>	TLAPH010-15	581
<i>Macrosiphoniella abrotani</i>	TLAPH011-15	584
<i>Macrosiphoniella oblonga</i>	TLAPH055-15	603
<i>Macrosiphum mordvilkoii</i>	TLAPH004-15	613
<i>Pemphigus filaginis</i>	TLAPH048-15	613
<i>Periphyllus aceris</i>	TLAPH071-15	653
<i>Therioaphis tenera</i>	TLAPH005-15	613

1	2	3
	GenBank	
<i>Aphis fabae mordvilkoii</i>	<u>MG027895</u>	474
<i>Aphis pomi</i>	<u>MG027896</u>	472
<i>Aphis spiraecola</i>	<u>MG027897</u>	617
<i>Colopha compressa</i>	<u>MF377443</u>	583
	<u>MG020467</u>	499
<i>Panaphis juglandis</i>	<u>MF377444</u>	631
	<u>MG029636</u>	910
<i>Uroleucon hypochoeridis</i>	<u>MF377446</u>	547
	<u>MG029629</u>	832
<i>Trichosiphonaphis corticis</i>	<u>MG029638</u>	918
<i>Gyphina jacutensis</i>	<u>MG020468</u>	766
<i>Anoecia corni</i>	<u>MG029630</u>	471
<i>Aphis euphorbiae</i>	<u>MG029635</u>	569
<i>Hyalopterus pruni</i>	<u>MG020469</u>	831
<i>Longicaudus trirhodus</i>	<u>MG020470</u>	786
<i>Therioaphis tenera</i>	<u>MG029634</u>	506
<i>Monaphis antennata</i>	<u>MG020471</u>	778
<i>Sipha maydis</i>	<u>MG029628</u>	609
<i>Periphyllus aceris</i>	<u>MG029632</u>	860
<i>Drepanosiphum platanoidis</i>	<u>MG029631</u>	736
<i>Schizolachmus pineti</i>	<u>MG029633</u>	779

Необходимо отметить, что для тлей *A. idaei*, *A. euphorbiae*, *A. podagrariae*, *C. compressa*, *D. junackianum*, *M. mordvilkoii*, *P. filaginis* и *P. aceris* нуклеотидная последовательность гена COI получена впервые, а для тлей *P. juglandis*, *U. hypochoeridis*, *T. corticis*, *G. jacutensis*, *A. corni*, *A. euphorbiae*, *H. pruni*, *L. trirhodus*, *S. pineti* – EF1a.

Расшифрованные нуклеотидные последовательности идентифицированы по существующему ДНК-штрихкоду путем компьютерного сравнения расшифрованной нуклеотидной последовательностью с ДНК-штрихкодами, хранящимися в BOLD и GenBank, а также депонированы в BOLD и GenBank. ДНК-штрихкоды хранятся в открытом доступе и могут быть использованы в дальнейшем для идентификации энтомологических образцов методом ДНК-штрихкодирования, изучения внутривидового и межвидового генетического полиморфизма и филогенетического анализа.

Исследования выполнены при финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (договор № Б22МВ-013).

Список использованных источников

1. Ratnasingham, S. BOLD: The Barcode of Life Data System (www.barcodinglife.org) / S. Ratnasingham // Molecular Ecology Note. – 2007. – Vol. 7, N. 3. – P. 355–364.
2. DNA barcoding: how it complements taxonomy, molecular phylogenetics and population genetics / M. Hajibabaei [et al.] // TRENDS in Genetics. – 2007. – Vol. 23, Iss. 4. – P. 167–172.
3. DNA barcoding for ecologists / A. Valentini [et al.] // Trends in Ecology and Evolution. – 2008. – Vol. 24, Iss. 2. – P. 110–117.
4. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates / O. Folmer [et al.] // Molecular Marine Biology and Biotechnology. – 1994. – Vol. 3, n. 5. – P. 294–299.
5. DNA barcodes distinguish species of tropical Lepidoptera / M. Hajibabaei [et al.] // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2006. – Vol. 103, n. 4. – P. 968–971.