

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИАГНОСТИКА ЧУЖЕРОДНЫХ ИНВАЗИВНЫХ ВИДОВ ТЛЕЙ

М.М. Воробьева

Полесский государственный университет, Пинск, masch.89@mail.ru

Биология – быстро развивающаяся наука современности. Крупные открытия в биологии (выявление структуры ДНК, полимеразная цепная реакция, создание ДНК-чипов, секвенирование), а также технические возможности позволили сформироваться целой группе методов, известных как молекулярные или молекулярно-генетические методы. На сегодняшний день эти методы широко применяются в смежных областях: медицине, криминалистике, археологии и т.д.

Необходимо отметить, что молекулярно-генетические методы в последние годы активно используются при изучении различных таксонов живых организмов, в том числе и насекомых. Особого внимания заслуживают чужеродные инвазивные виды, негативно влияющие на биоразнообразие, а также наносящие серьезный экономический ущерб [1].

В настоящее время на территории Беларуси из мирового списка, включающего 100 наиболее вредоносных инвазивных видов животных, уже отмечено 8 видов, а за последние 5 лет данный список расширился ввиду более углубленного изучения биологического разнообразия животного

мира. В Республике Беларусь опубликовано первое издание «Черная книга инвазивных видов животных Беларуси» под научной редакцией член-корреспондента НАН Беларуси В.П. Семенченко в 2016 г. (издательство «Беларуская навука»), основной задачей которого является контроль проникающих в окружающую среду инвазивных чужеродных видов животных. Второе издание под общей редакцией член-корреспондента НАН Беларуси В.П. Семенченко, профессора кафедры зоологии биологического факультета БГУ С.В. Буги вышло в свет в 2020 г. и дополнено инвазивными видами – вредителями сельского и рыбного хозяйства, а также карантинными видами, наносящими социальный ущерб [1]. Поскольку чужеродные инвазивные виды обладают высокой пластичностью и скоростью размножения, что позволяет им осуществлять экспансии на новые территории и в новые экосистемы, быстро увеличивать численность, подавлять или вытеснять аборигенные виды, а также наносить серьезный экономический, экологический и социальный ущерб, необходимо осуществлять их корректную видовую идентификацию не только морфологическими, но и молекулярно-генетическими методами, изучать их численность, ареал, особенности биологии, а также морфологический и генетический полиморфизм [1–3].

Цель работы – экстрагировать ДНК из пула чужеродных инвазивных видов тлей, коллектированных в Брестской, Гомельской, Могилевской и Минской областях, а также подобрать праймеры для получения целевого фрагмента в ПЦР.

Выделение ДНК осуществляли из 12 образцов тлей, коллектированных в Брестской, Гомельской, Могилевской и Минской областях (таблица 1).

Таблица 1. – Образцы тлей, коллектированных в Брестской, Гомельской, Могилевской и Минской областях, используемые для экстракции ДНК

Дата сбора	Административная точка	Адрес/GPS-координаты	Кормовое растение	Вид вредителя	№ пробы
13.07.2022	Минская обл., г. Клецк	ул. Орловская, 7	Орех грецкий	<i>Panaphis juglandis</i>	22-1430
13.07.2022	Минская обл., г. Клецк	ул. Панкратовская, 11	Смородина красная	<i>Cryptomyzus ribis</i>	22-1431
28.07.2022	Могилевская обл., г. Могилев	городской парк	Тополь пирамидальный	<i>Pemphigus spyrothecae</i>	22-1445
14.08.2022	Минская обл., г. Минск	ул. Старовиленская, 133	Робиния обыкновенная	<i>Aphis craccivora</i>	22-1464
27.07.2022	Гомельская обл., г. Мозырь	ул. Первомайская, 75	Спирея иволистная	<i>A. pomi/ A. spiraecola</i>	22-1439
28.07.2022	Могилевская обл., г. Кричев	ул. Советская, 54	Алыча	<i>Brachycaudus divaricatae</i>	22-1450
20.08.2022	Минская обл., г. Клецк	городской парк	Клен белый, или явор	<i>Drepanosiphum platanooidis</i>	22-1470
06.08.2022	Брестская обл., Кобринский р-н, д. Верхолесье	ул. Чкалова, 45	Орех грецкий	<i>Panaphis juglandis</i>	22-1459
27.07.2022	Гомельская обл., г. Мозырь	ул. Первомайская, 75	Спирея иволистная	<i>A. pomi/ A. spiraecola</i>	22-1440
30.08.2022	Минская обл., г. Минск	ЦБС НАН Беларуси	Бук европейский	<i>Phyllaphis fagi</i>	22-1472
17.07.2022	Минская обл., г. Клецк	ул. Советская, 40	Алыча	<i>Brachycaudus divaricatae</i>	22-1434
17.07.2022	Минская обл., г. Клецк	ул. Советская, 40	Алыча	<i>Brachycaudus divaricatae</i>	22-1434

Для выделения ДНК использовали набор реагентов «Нуклеосорб» (комплектация «С»), адаптировав методику для работы с пулом образцов.

В каждую пробирку типа «эппендорф» с пулом тлей (8 экземпляров) отдельными наконечниками с аэрозольным барьером вносили по 200 мкл лизирующего раствора «С» и по 8,5 мкл раствора протеиназы К, тщательно перемешивая содержимое пробирок. Инкубировали эти пробирки при

температуре 60°C в течение 2 ч, периодически встряхивая на вортексе. Нерастворенные частицы осаждали центрифугированием при 14 тыс об/мин в течение 5 мин. Надосадочную жидкость в объеме 130 мкл очень аккуратно отбирали отдельными наконечниками с аэрозольными барьерами и переносили в чистые пробирки типа «эппендорф», а пробирки с осадком выбрасывали. В каждую пробирку типа «эппендорф» отдельным наконечником добавляли по 12,5 мкл ресуспендированного сорбента универсального, перемешивали и оставляли в штативе на 10–15 мин. Осаждали сорбент универсальный в пробирках центрифугированием при 5 тыс об/мин в течение 1 мин и удаляли надосадочную жидкость. Добавляли в пробы по 150 мкл раствора для отмывки «1», перемешивали на вортексе до полного ресуспендирования сорбента универсального, осаждали его центрифугированием при 5 тыс об/мин в течение 1 мин. Надосадочную жидкость удаляли. Добавляли в пробы по 250 мкл раствора для отмывки «2», перемешивали на вортексе до полного ресуспендирования сорбента универсального, центрифугировали 1 мин при 10 тыс об/мин, надосадочную жидкость отбирали (данный пункт повторили 2 раза). Пробирки помещали в термостат при температуре 64°C на 10 мин для подсушивания сорбента универсального. В пробирки добавили по 50 мкл ТЕ-буфера для элюции ДНК, перемешивали на вортексе. Помещали в термостат при температуре 64°C на 10 мин, периодически встряхивая на вортексе. Пробирки центрифугировали при 12 тыс об/мин в течение 1 мин. Надосадочная жидкость содержит очищенную ДНК в объеме 50 мкл.

Концентрацию ДНК и степень ее очистки определили на спектрофотометре Nanodrop 1000 (таблица 2).

В качестве дополнительного способа количественной и качественной оценки препарата выделенной ДНК провели гель-электрофорез в агарозном геле (рисунок). Образец 22-1440 был исключён из исследования ввиду очень низкой концентрации.

Таблица 2. – Результат определения концентрации ДНК на спектрофотометре

№ образца	Концентрация, нг/мкл	Степень очистки
22-1430	510,9	2,09
22-1431	62,3	2,08
22-1445	92,1	2,01
22-1464	480,9	1,02
22-1439	210,8	2,11
22-1450	341,0	2,07
22-1470	112,9	2,06
22-1459	107,9	2,08
22-1440	7,9	2,00
22-1472	371,2	2,11
22-1434	50,8	2,04
22-1434	334,6	2,18

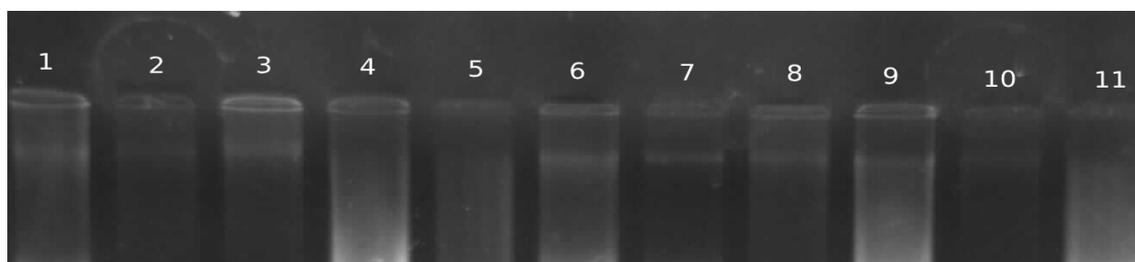


Рисунок – Гель-электрофорез ДНК, выделенной из чужеродных инвазивных видов тлей

Результаты гель-электрофореза указывают о выделении ДНК из образцов: 1, 2, 3, 6, 7, 8, 9, 10. Данные образцы будут использованы для дальнейшего исследования.

Кроме того, в рамках настоящего исследования отработан протокол для проведения ПЦР и подобраны праймеры для получения целевого фрагмента. Для получения фрагмента гена субъединицы 1 цитохром-с-оксидазы (СОI) принято решение модифицировать этап отжига праймера, а именно, в первых 5 циклах температуру отжига праймеров понизить до 45 °С, а последующие 30

циклов ПЦР провести при температуре 50 °С. Понижение температуры отжига праймеров в начальных циклах позволит увеличить выход продукта в ПЦР до количеств, достаточных для проведения прямого секвенирования ПЦР-продукта. Кроме того, для работы с образцами тлей принято решение использовать праймеры LepF/LepR (таблица 3).

Таблица 3. – Праймеры, использованные для получения целевого фрагмента

Праймер	Последовательность, 5'–3'	T _a °	Размер получаемого фрагмента, п.н.
LepR LepF	ATTCAACCAATCATAAAGATATTGG TAAACTTCTGGATGTCCAAAAAATCA	45	721
HCO2198 LCO1490	TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAAATCA GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG	50	1100

Примечание – T_a – температура отжига праймера

Таким образом, отработано протокол выделения ДНК из пула тлей, а также подобраны праймеры и модифицирован протокол для получения целевого фрагмента гена субъединицы 1 цитохром-с-оксидазы (COI).

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

Список использованных источников

1. Черная книга инвазивных видов животных Беларуси / В.П. Семенченко [и др.]; под общ. ред. В.П. Семенченко, С.В. Буги; нац. акад. наук Беларуси, науч.-практ. Центр по биоресурсам. – Минск: Беларуская наука, 2020. – 163 с.
2. 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: 11.10.2023.
3. Evolutionary and genetic aspects of aphid biology: A review / D.F. Hales [et al.] // Eur. J. Entomol. – 1997. – Vol. 94, n. 1. – P. 474–487.