DOI:10.26104/NNTIK.2019.45.557

БИОЛОГИЯ ИЛИМДЕРИ
БИОЛОГИЧЕСКИЕ НАУКИ
BIOLOGICAL SCIENCES

Камбаров Н.Б., Милько Д.А., Абдыкапарова А.О.

ЭНТОМОЛОГИЯЛЫК ИЗИЛДӨӨЛӨРДҮН ЗАМАНБАП МЕТОДДОРУ: ДНК-БАРКОДИНГ

Камбаров Н.Б., Милько Д.А., Абдыкапарова А.О.

СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ В ЭНТОМОЛОГИИ: ДНК-БАРКОДИНГ

N.B. Kambarov, D.A. Milko, A.O. Abdykaparova

MODERN RESEARCH METHODS IN ENTOMOLOGY: THE DNA-BARCODING

УДК: 595.7: 574.2(575.2) (04)

Макалада энтомологиядагы традициялык методдор менен курт-кумурскалардын түрлөрүн идентификациялоонун айрым проблемаларына жана аларды молекулярдык биологиянын методдору, тагыраак айтканда ДНК-баркодингдөөнүн жардамында чечүүнүн жолдору берилген. Бул метод «ДНК-штрихтөө» деп да аталат. ДНК-баркодинг – бул ДНКнын кыска генетикалык маркери боюнча объекттин кайсы түр экендигин аныктоого мүмкүндүк берүүчү молекулалык идентификациялоо методу, Консервативдик локус болуп саналуучу цитохромоксидаза - I гениндеги нуклеотиддердин жуптарынын алынган ырааттуулугу штрих-кодго коддоштурулушу мүмкүн. Ал салыштырмалуу анализ үчүн ыңгайлуу. Генетикалык банкта ар кандай организмдерден алынган штрих-коддор канчалык көп болсо, аларды туура жана тез аныктоого мүмкүнчүлүк түзүлөт. Чара баш коңуздардын таксономиясын жана филогениясын ДНК-баркодингдөөнүн жардамында изилдөө перспективалуу болуп саналат. ДНК-баркодингдөөнүн жардамында чара баш коңуздар изилденди, сенквенирлөө жүргүзүлдү жана натыйжалары анализделинди. Кылымдын башынан бери бул жаңы метод кеңири колдонулуп жатат, себеби анын терс жактарына караганда оң жактары көбүрөөк.

Негизги сөздөр: *энтомологиялык изилдөөлөр, молекулярдык биология, курт-кумурска, чара баш коңуздар, популяция, идентификациялоо, ДНК-баркодинг, секквенирлөө, генбанк.*

В статье дан обзор некоторых проблем идентификации видов насекомых в энтомологии традиционными методами, и возможные пути их решения с помощью методов молекулярной биологии, а точнее ДНК-баркодирования (иное название - «ДНК-штрихование»). ДНК-баркодинг – это метод молекулярной идентификации, который позволяет по коротким генетическим маркерам ДНК определять принадлежность объекта к определенному виду. Полученные последовательности пар нуклеотидов в гене цитохромоксидазы-I, являющемся консервативным локусом, могут быть закодированы в штрих-коды, которые удобны для сравнительного анализа. Чем больше штрих-кодов от разных организмов будет в генетическом банке, тем вероятнее их правильное и быстрое определение. Изучение таксономии и филогении кравчиков с помошью ДНК-баркодирования является перспективным. С помошью ДНК-баркодирования изучен жуки-кравчики, произведен секвенирование и анализирован результаты. С начала века этот новый метод уже находит широкое применение, так как содержит в себе большее количество плюсов, чем минусов.

Ключевые слова: *энтомологические исследования, молекулярная биология, насекомые, жуки-кравчики, популяция, идентификация, ДНК-баркодинг, секквенирование, генбанк.*

The article provides an overview of some problems of insect species identification with traditional entomological methods, and possible ways using molecular biology techniques, namely DNA barcoding. DNA barcoding is a method of molecular identification, which allows for short genetic markers of DNA to determine the belonging of an object to a certain type. The obtained sequences of nucleotide pairs in the cytochrome oxidase-I gene (which gene is conservative locus) can be encoded into barcodes suitable for comparative analysis. The more barcodes from different organisms will be in the genetic bank, the more likely their correct and quick identification. The study of the taxonomy and phylogeny of Lethrus scarab beetles using DNA barcoding is promising. With the help of DNA barcoding studied kravchiki beetles, produced produced sequencing and analyzed results. Since the beginning of the century this new method already finds wide application, as it contains more pluses than minuses.

Key words*: entomological studies, molecular biology, insect, Lethrus, population, identification, DNA barcoding, sequencing, genebank.*

DOI:10.26104/NNTIK.2019.45.557

Введение.

Энтомология – это наука о насекомых. Предполагаемое число видов насекомых, обитающих на Земле, по разным данным составляет от 3 до 30 миллионов. На каждого человека приходится примерно 200 миллионов особей. Эти цифры свидетельствуют о том, что кругом и полностью нас окружают насекомые и они в значительной степени формируют биоценозы на нашей планете. Вследствие огромного числа видов насекомых, филогенетические отношения между ними и многие региональные фауны до сих пор слабо изучены. Ежегодно открываются и получают научные названия от 3 до 10 тысяч новых видов.

Энтомологические исследования носят не только познавательный характер, но имеют еще и экономическое значение, так как из общего числа видов более половины являются фитофагами. Растительно ядные насекомые могут массово заселять сельскохозяйственные угодья. Не менее 1/5 части выращиваемой сельскохозяйственной продукции уничтожается насекомыми [1, 5].

Для проведения исследований мы должны особо выделить и напомнить о том, что многие виды растений и животных, которые 20-30 лет назад были обычными, сейчас стали редкими и исчезающими. Такие исследования дают большие возможности для ознакомления с научными основами охраны природы [6].

Проблемы идентификации видов насекомых заключаются в том, что нет одного алгоритма, по которому можно было бы дать определение тому или иному виду. Существует колоссально большое количество книг с определительными таблицами, начиная от отрядов и заканчивая видами (подвидами). В многообразии комбинаций диагностических признаков и субъективности их описаний и заключается проблемы идентификации видов. Для этих операций требуется большое количество ресурсов; под ресурсами имеются в виду время, опыт, литература, оборудование и т.д.

Приводим примеры сложностей определения. В природе существует такое явление, как виды-двойники, которые морфологически сходны, внешне практически неразличимы, но эта схожесть не наблюдается на генетическом уровне, что свидетельствует об их видовой самостоятельности.

Шапошниковым Г.Х. проводились эксперименты, где две группы из популяции одного вида тлей из рода *Dysaphis* помещали в разные условия. По окончании времени изоляции, продлившейся около десятка поколений, объединенные в одну группу тли уже не могли скрещиваться друг с другом, и совершенно по-разному вели себя. Кроме того, удивляет то, что эти тли не могли скрещиваться с тлями из контрольной группы, да и этология у них разнилась. Выходит, что, не смотря на морфологическое сходство, группы тлей, участвовавших в эксперименте, претерпели микроэволюцию [2].

Также другой пример: Г.В. Николаевым в книге «Жуки-кравчики» [3] было отмечено, что представители подсемейства *Geotrupinae* крайне тяжело поддаются определению. При ограниченной ценности анализа морфологических признаков надежды неизбежно фокусируются на изучении молекулярно-генетических данных [4]. Все это из-за того, что кравчики полиморфны и их морфология характеризуется крайне малым количеством значащих признаков [3]. По этой причине идентификация некоторой части экземпляров кравчиков в коллекции Института биологии НАН КР (=IBB) не представляется возможной. На рисунках 1 и 2 представлены такие «проблемные» коллекционные экземпляры из некоторых популяций на юге республики.

Рис. 1. Самцы трех по-видимому конспецифических форм из одной популяции (материалы IBB).

Рис. 2. Самки трех заведомо различных популяций (материалы IBB).

DOI:10.26104/NNTIK.2019.45.557

Материал и методика. Вышеупомянутые проблемы идентификации могут быть решены современными методами исследований.

ДНК-баркодинг – это метод молекулярной идентификации, который позволяет посредством сравнения относительно коротких генетических маркеров ДНК определять принадлежность объекта к определенному виду. В настоящее время для этой цели премущественно используется участок гена субъединицы I митохондриальной цитохром-с-оксидазы (COI), состоящий примерно из 600 пар нуклеотидов. Данный метод хорошо испытан и широко применяется в передовых странах для определения принадлежности образцов к одному виду, т.е для установления конспецифичности. Для использования этого метода обычно получают ДНК-штрих-код от образца, видовая принадлежность которого точно идентифицирована специалистом-систематиком, после чего ДНК-материал подвергается обработке и подготовке к секвенированию. Секвенированный ген объекта помещается в GenBank, где подписанные последовательности будут находиться в свободном доступе. Пополняя базу данных генбанка, мы увеличиваем вероятность идентификации сравниваемых образцов, это в будущем облегчит определение видов.

Главным плюсом идентификации молекулярным методом является то, что все процессы выполняются по общему протоколу, а это значит, что данный способ характеризуется малой субъективностью. Единый алгоритм действий по протоколу делится на этапы, а они, в свою очередь, на пункты.

1-ый этап – сбор материала. Сбор материала имеет несколько пунктов. Первым пунктом мы должны иметь базовую комплектацию, чтобы умертвить насекомое и не допустить разложения тканей. Для предотвращения разложения используют медицинский этиловый спирт и пробирки, в которых экземпляры заливаются спиртом. Из-за того, что спирт является сильно-полярным соединением, он предотвращает дальнейшее гниение и блокирует развитие микроорганизмов. Вторым пунктом, на что стоит обратить внимание, это – заменить спирт, которым насекомое было умерщвлено, на новую порцию спирта, а также следить за температурой хранения (чем холоднее – тем лучше). И третьим пунктом данного этапа является хранение в морозильнике при –20°C (желательно). На этом заканчивается этап сбора материала для молекулярных исследований.

2-ой этап – наработка амплифицированных локусов ДНК. На этом этапе ДНК-продукт извлекается из заспиртованных образцов насекомых, амплифицируется и в конечном счете подготавливается к секвенированию. Данный этап будет описан кратко.

Пункт первый: взять небольшое количество генного материала из насекомого. Для этого подойдет и конечность, не важно, какая – главное, чтобы в ней находилось побольше мышечной ткани.

Пункт второй: экстракция. Спирт из кусочка образца удаляется сушкой в вакуумной центрифуге. Затем высушенный фрагмент образца варится в протеазе для расщепления белков, в результате из макромолекул в растворе остаются только нуклеиновые кислоты.

Пункт третий заключается в добавлении в полученный экстракт праймеров, которые свяжутся с локусом COI, для выделения именно этого участка ДНК. Затем раствор помещается в аппарат ПЦР где настраивается градиент температур для захватывания праймерами нужного участка ДНК.

Пункт четвертый – это контрольный просмотр полученных продуктов (амплифицированного локуса ДНК) на геле. Это позволяет увидеть, насколько хорошо исследуемый ген был схвачен праймерами. Выглядит это так (рисунок 3).

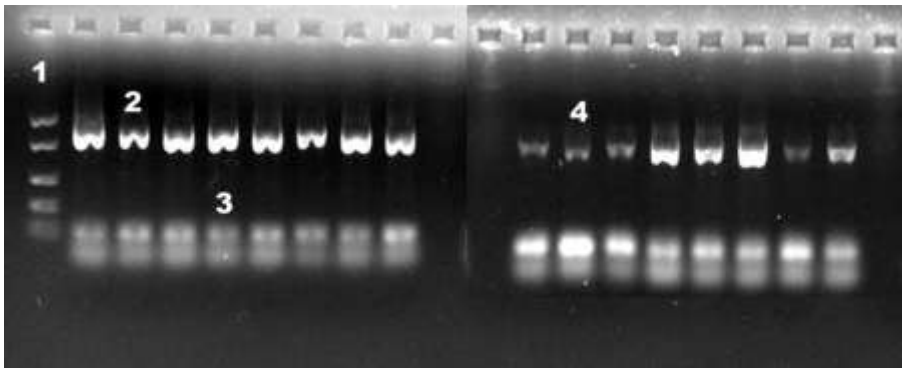

Рис. 3. Контрольный снимок геля с выкрашенными продуктами после ПЦР.

DOI:10.26104/NNTIK.2019.45.557

Здесь цифрой 1-обозначена область калибровки («контроль качества гель-электрофореза»). 2-пример хорошего продукта (безусловно пригоден для секвенирования). 3-димеры (продукты взаимодействия молекул праймеров друг с другом) и различные примеси. 4-пример продукта с малым количеством генетического материала (результаты секвенирования заведомо будут некачественными).

Пункт пятый: очистка материала ПЦР-продукта при помощи ExoStar (реагент «ЭкзоСтар» предназначен для очистки от ненужных димеров, примесей и остатков, после чего продукт можно подвергать секвенированию).

3-й этап – секвенирование. Выделенный и очищенный продукт готов для определения последовательности пар нуклеотидов на специальных аппаратах. Затем эти последовательности (для целей ДНК-баркодинга стандартным является ген COI) заносятся в генбанк, и те из них, которые выделены из идентифицированных систематиками образцов, становятся своего рода эталонами для идентификации методом сравнения.

Результаты и заключение. Техника ДНК-баркодирования, т.е. получения последовательности нуклеодидов в локусе COI, была отработана в молекулярной лаборатории Зоологического музея Университета Осло на 86 экземплярах жуков-кравчиков. Кравчики из девяти популяций на территории Кыргызстана были отловлены (почти все – лично) и идентифицированы (небольшая часть образцов – предварительно) вторым автором. Второй этап, алгоритм которого занимает три полных рабочих дня, был повторен (первым автором) четырежды – по числу порций образцов (работать с порциями 30+ экземпляров неудобно и крайне утомительно).

Результаты однозначно свидетельствуют о том, что именно для этой группы насекомых нужно сконструировать специальные (специфические) праймеры, т.к. предложенная для тренинга в лаборатории пара «универсальных» праймеров не дала удовлетворительных результатов даже при вариировании режимов на ПЦР-машине.

Изучение таксономии и филогении кравчиков с помошью ДНК-баркодирования является перспективным по нескольким причинам. Род *Lethrus* Scopoli, 1777 – это группа, наиболее богатая видами в Средней Азии. У них, как у многих бескрылых созданий, высок уровень регионального эндемизма, а видовые ареалы часто крайне малы. Изменчивость и вариабельность наружных морфологических признаков кравчиков в целом объяснены пока неудовлетворительно. Так, одной из причин, почему в одних и тех же популяциях (причем у разных видов) встречаются крупные самцы с хорошо развитыми мандибулярными отростками, и мелкие самцы с почти шиловидными «недоразвитыми» мандибулярными отростками (эта «клинальная» изменчивость наглядно представлена на рисунке 1), может быть разница в количестве и качестве личиночного провианта, запасенного родителями. Однако эмпирически эта гипотеза до сих пор не проверена, и для исследования причин вариабельности, а также для разграничения ареалов видов, самым трудным препятствием является надежная идентификация. Преодолеть это препятствие представляется возможным лишь с применением молекулярно-генетическими методов на репрезентативных материалах.

Конечно же, на данный момент не каждый желающий может производить секвенирование и анализировать результаты, но, как мы знаем, с течением времени новые технологии будут совершенствоваться и дешеветь. Можно сказать, что энтомологи-практики надеются на ДНК-баркодинг как на своеобразную «таблетку от всех болезней», связанных с трудностями распознавания биологических видов.

Благодарности. Ознакомление с техникой ДНК-баркодирования и практикой применения молекулярных методов в энтомологических исследованиях было осуществлено благодаря участию первого и второго авторов в проекте CPEA-LT-2016/10140 "Training the new generation of entomologists in DNA-based molecular methods – international network (EntoMol)". Авторы выражают за это признательность главному координатору проекта доктору В.И. Гусарову (университет Осло, Норвегия) и партнеру от Кыргызской Республики профессору Б.М. Дженбаеву (НАН КР).

Литература:

1. Мирзоян С.А. Насекомые и биосфера [Текст] / С.А. Мирзоян, Б.М. Мамаев. - М.: Агропромиздат, 1989. - 208 с., 24 с. ил.
2. Чеховская Т.П. Ошеломляющее разнообразие жизни [Текст] / Т.П. Чеховская, Р.Л. Щербаков. - Изд. 2-е, дораб. и доп. - М.: Знание, 1990. - 128 с.
3. Николаев Г.В. Жуки-кравчики (Scarabaeidae, Geotrupinae, Lethrini): биология, систематика, распространение, определитель [Текст] / Г.В. Николаев. - Алматы: Қазақ университеті, 2003. - 173 с.
4. Wiley E.O. Phylogenetics: Theory and practice of phylogenetic systematics. [Text]/E.O Wiley, B.S. Lieberman. - 2-nd edition. - New Jersey & Singapore: Wiley-Blackwell, 2011. - 406 pp.
5. Турмаханбет А.М. Биоэкология и динамика популяций саранчовых на территории Кордайского района [Текст] / Турмаханбет А.М., А.О. Абдыкапарова // Известия вузов Кыргызстана. - Б., 2017. - №5. - С. 117-120.
6. Абдрахманова Б.С. Организация и методика проведения зоологических экскурсий (7-кл.) [Текст]/Б.С. Абдрахманова, С.К. Кендирбаева, М.Т. Турсуналиева // Известия вузов Кыргызстана. - Б., 2017. - №11. - С. 107-109.