

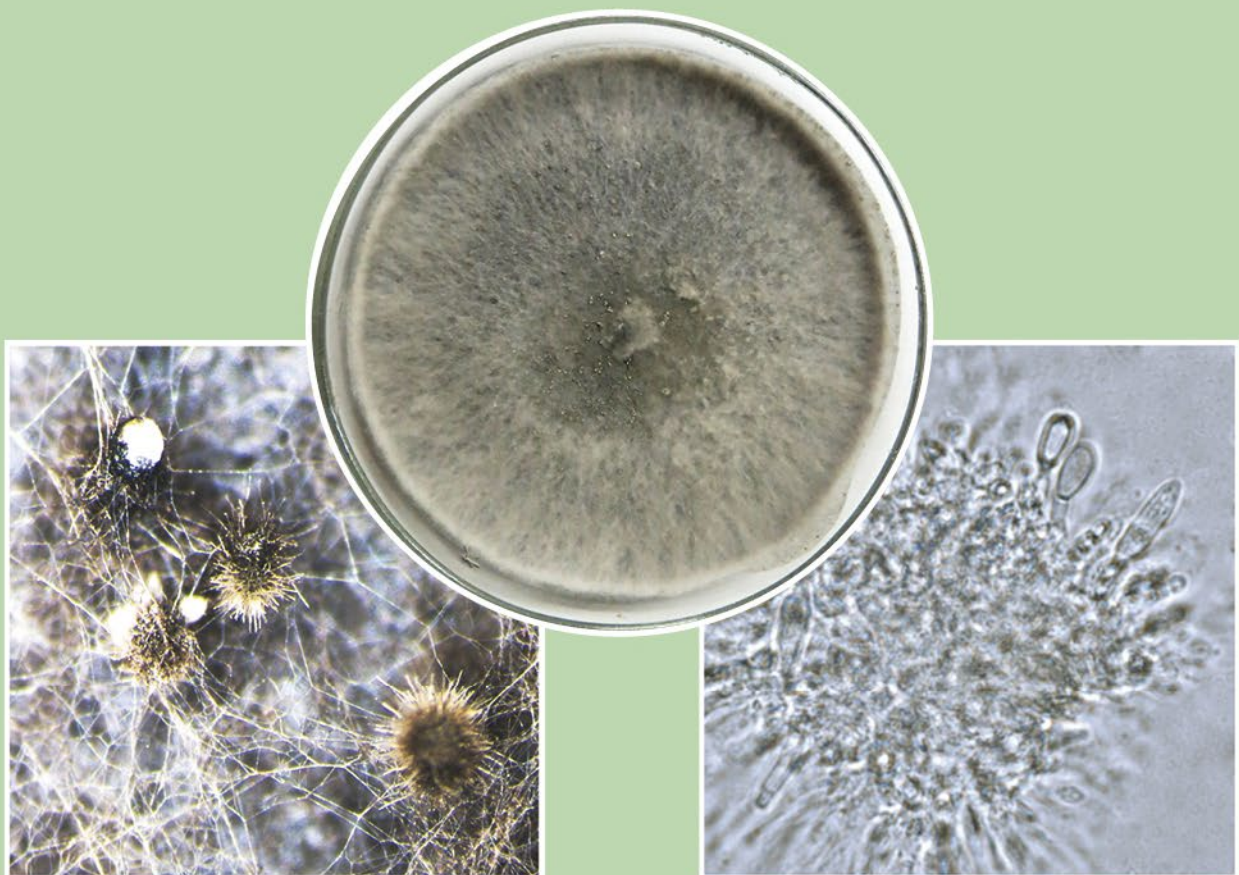


ISSN 1727-1320 (Print),
ISSN 2308-6459 (Online)

ВЕСТНИК ЗАЩИТЫ РАСТЕНИЙ

PLANT PROTECTION NEWS

2021 TOM ВЫПУСК
 VOLUME 104 ISSUE 4



Санкт-Петербург
St. Petersburg, Russia

ВВЕДЕНИЕ В МОЛЕКУЛЯРНУЮ ДИАГНОСТИКУ НАСЕКОМЫХ**А.С. Рябинин*, Р.А. Быков, В.К. Лапшина, А.А. Маслакова, М.А. Деменкова, Ю.Ю. Илинский***Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск** ответственный за переписку, e-mail: art@bionet.nsc.ru

Насекомые, благодаря своей многочисленности и широкой распространенности, играют важную роль в биоценозах. Многие насекомые являются вредителями сельскохозяйственных культур. Эффективная борьба с насекомыми-вредителями возможна только при их правильной идентификации, что обычно решается морфологическими методами анализа. Молекулярно-генетические методы позволили расширить возможности исследователей в изучении многих вопросов биологии насекомых, и, в частности, их диагностики на любых стадиях жизненного цикла, с чем обычно не справляется традиционный подход. Данный обзор охватывает широкий спектр вопросов, связанных с молекулярно-генетическим анализом насекомых. В первом разделе обсуждаются способы фиксации и хранения материала, и их влияние на сохранность ДНК насекомых. Далее приводится общая информация по дизайну популяционных исследований, а именно определению объема выборки, необходимой для исследования. Большое внимание уделено рассмотрению различных схем выделения ДНК из насекомых, приводятся примеры как экспресс-методик, так и более тщательных протоколов для получения ДНК высокой степени очистки. Рассматриваются методы выделения ДНК, позволяющие сохранить целостность насекомых для дальнейших морфологических исследований. Подробно описываются методы проверки качества полученного генетического материала, что особенно важно для дальнейшего анализа путем полимеразной цепной реакции (ПЦР). В последнем разделе приводятся различные методы ПЦР-анализа ДНК и примеры их практического применения для решения различных фундаментальных и прикладных задач в исследованиях насекомых, например, в таксономическом определении образцов, определении пола особей, поиске различных патогенов и симбионтов, выяснении пищевых предпочтений и др.

Ключевые слова: ПЦР, насекомые, образец, ДНК, праймеры, секвенирование*Поступила в редакцию: 10.07.2021**Принята к печати: 15.12.2021*

Насекомые – важный компонент большинства наземных экосистем, играющий ключевую роль в их поддержании (Weisser, Siemann, 2008; Yang, Gratton, 2014). Многие насекомые выступают серьезными вредителями леса и сельскохозяйственных культур (Schabel, 2010). Особую опасность представляют инвазивные виды, которые способны наносить колоссальный урон на новых территориях. В настоящее время для изучения биологии и идентификации этих насекомых активно используются различные молекулярно-генетические методы, которые постоянно совершенствуются (Asghar et al., 2015). Это приводит к появлению большого количества различных протоколов как подготовки материала к исследованию, так и самого анализа ДНК. Достижения технологий секвенирования ДНК позволили исследователям проводить простые, быстрые и

экономически рентабельные исследования генетического материала.

В настоящее время существует большое количество обзоров, посвященных отдельным направлениям работы с энтомологическим материалом: от фиксации образцов и выделения ДНК (Post et al., 1993; Asghar et al., 2015; Moreau et al., 2013) до методов ПЦР и секвенирования (Jinbo et al., 2011; Jalali et al., 2015; Ghobari, Zamani, 2020; Siozios et al., 2020). Предлагаемый обзор охватывает широкий спектр вопросов, начиная от методов хранения и фиксации насекомых, выделения и оценки качества ДНК до молекулярно-генетических методов анализа и их приложения для решения фундаментальных и прикладных задач. Подобных работ в настоящее время крайне мало, особенно на русском языке.

Хранение и подготовка материала к экстракции ДНК

Материал, используемый в генетических исследованиях можно разделить на два типа: 1) собранный специально для анализа ДНК и 2) хранящийся в энтомологических коллекциях, то есть изначально экземпляры насекомых не планировали использовать для анализа ДНК (как правило экземпляры на булавках или приклеены). Способ хранения материала может влиять на его сохранность и, как следствие, успешность проведения исследования.

Ключевое условие для сохранения ДНК – быстрое обезвоживание образцов. В качестве альтернативного приема

применяют низкотемпературное хранение (Quicke et al., 1999; Mandrioli, 2008). На практике материал обезвоживают, высушивая на воздухе (суховоздушный метод), или водоотнимающим веществом, чаще всего этанолом (Post et al., 1993; Dillon et al., 1996; Mandrioli, 2008; Nakahama et al., 2019). Фиксация насекомых в этиловом спирте не всегда удобна, поскольку размер экземпляров и плотность хитинового покрова влияют на эффективность дегидратации спиртом (Quicke et al., 1999; Reiss et al., 1995; Mandrioli et al., 2006). Для крупных экземпляров оптимальное

решение может быть достигнуто путем нанесения надрезов/отверстий в покровах (Quicke et al., 1999) или инъекцией спирта в полость тела с помощью шприца. Здесь следует отметить, что добавляемые в пластиковую посуду пластификаторы могут переходить в этанол и отрицательно влиять на качество ДНК. Желательно хранить спирт в стеклянных или «проверенных» пластиковых емкостях, а также избегать низкокачественной лабораторной пластиковой тары от неизвестных производителей. Еще одним фиксатором, хорошо сохраняющим образцы для анализа, может служить ацетон (Fukatsu, 1999). Изначально его использовали (и используют) для сохранения натуральной окраски насекомого, но этот способ оказался удобным также и для фиксации ДНК. Для ряда других фиксирующих жидкостей (раствор Карнуа, хлороформ, метанол, пропанол, формалин) показана плохая способность сохранять целостность генетического материала в образцах (Post et al., 1993; Quicke et al., 1999; Mandrioli, 2008). Например, формалин приводит к сшивкам белков и ДНК, а также её фрагментации. В последнее десятилетие активно развиваются методические подходы на основе секвенирования следующего поколения (Next Generation Sequencing, NGS), позволяющие восстанавливать первичную структуру ДНК образцов, фиксированных в формалине (Haile et al., 2019).

В качестве фиксатора может использоваться раствор DESS (ДМСО, ЭДТА, NaCl), который успешно протестирован на нематодах (Yoder et al., 2006) и насекомых (Dodge et al., 2017). Фиксированные особи сохраняли структурные особенности, важные для морфологического анализа, оставаясь пригодными для амплификации ДНК в течение нескольких месяцев при комнатной температуре. Фактически, обработка DESS представляет собой альтернативу фиксации этанолом.

Для консервации ДНК образцы могут быть и просто высушены на воздухе. Например, в энтомологических коллекциях материал часто хранится именно в сухом

состоянии на ватных слоях (маграсики), в бумажных конвертах, на энтомологических булавках (Голуб и др., 2021). В сухих условиях окружающей среды такой материал хорошо хранится и при комнатной температуре, а если влажность высокая, то он сохраняет пригодность лишь ограниченное время (Quicke et al., 1999; Nakahama et al., 2019). При «суховоздушном» способе фиксации наилучший результат по сохранению ДНК получается с мелкими насекомыми, которые быстро теряют воду, в то время как крупные насекомые сохнут хуже, что может привести к плесневению и гниению (Quicke et al., 1999).

Метод криоконсервации в жидком азоте с последующим хранением при -70 – -80 °С относится к одним из наиболее надежных для сохранения целостности морфологических структур и генетического материала образца. Однако этот подход требует специального оборудования и редко доступен в полевых условиях. Здесь необходимо учитывать, что многократное размораживание/замораживание негативно сказывается на качестве материала (Quicke et al., 1999).

Альтернативой криоконсервации для особо ценных образцов могут служить различные коммерческие реагенты, например, Allprotect Tissue Reagent (Qiagen) или RNAlater (Ambion), позволяющие без использования жидкого азота и сухого льда фиксировать ДНК образцов до 1 суток при 37 °С, до 7 суток при комнатной температуре, до 4 недель при 2 – 8 °С или неограниченно при -20 или -80 °С (Gorokhova, 2005; Nagy, 2010; Peña-Llopis, Brugarolas, 2013; Silva et al., 2021). Важно, что повторная разморозка/заморозка образца не нарушает сохранность ДНК, однако морфологические структуры могут пострадать.

В зависимости от того, каким способом зафиксирован материал для исследования, выбирается методика дальнейшего анализа, в частности, определяется протокол выделения ДНК. Также необходимо определить, какой объем материала будет достаточен для проведения исследования.

Объем выборки для анализа

Если необходимо проанализировать качественный признак образца, например, установить видовую принадлежность штрих-кодированием (баркодинг) (Hebert et al., 2003), то для анализа вполне достаточно одной особи. Однако, сравнение популяций по частотам аллелей и наличию симбионтов, определение частот встречаемости признака, инфицированности патогенными микроорганизмами и другие количественные оценки требуют анализа выборок определённого объема. Размер выборки зависит от поставленных перед исследователем целей и задач, что хорошо известно из учебников по биометрии. Неосновательно большой объем выборки приводит к увеличению себестоимости и трудозатрат, а слишком малая выборка не обладает достаточной разрешающей способностью выявления исследуемого признака или установления значимых различий между сравниваемыми группами. Если при исследовании выборки признак выявлен с некоторой частотой, то доверительный интервал покажет, в каком диапазоне может находиться истинное значение признака в генеральной совокупности (Wilson, 1927; Clopper, Pearson, 1934; Wald, Wolfowitz, 1939; Agresti, Coull, 1998; Гржибовский, 2008). Например, признак не был найден ни у одной из 10 особей, собранных в популяции. Для этого значения

доверительный интервал с уровнем достоверности 95% составляет 0–30%. То есть нельзя утверждать, что этого признака в данной популяции (генеральной выборке) нет, но можно говорить, этот признак «либо отсутствует, либо не превышает 30%». С увеличением объема выборки на порядок границы интервала также сужаются на порядок: для 100 особей – 0–30%, для 1000 – 0–0.3%. Если признак найден в 10% случаев, то доверительный интервал для выборок меняется следующим образом: для 10 образцов – 0.25–44.0%, для 100 – 4.9–17.6%, для 1000 – 8.2–12.0%.

При поиске признака в больших выборках образцы можно объединять в пулы (от английского pool – общий фонд, объединение). Такой прием может значительно сократить трудозатраты, поскольку, при обнаружении признака в одном из исследуемых пулов, достаточно провести индивидуальный анализ образцов, входящих в его состав, исключив из дальнейшего анализа отрицательные пулы. Однако зачастую для организмов малой размерности, образцы объединяются в пулы еще до выделения ДНК. Это не позволяет провести последующий индивидуальный анализ образцов, но отметим, что существуют методы расчета частоты признака и определения доверительного интервала (Gu et al., 2003; Ebert et al., 2010). Например,

если выборка, состоящая из 100 особей, разделена на 20 пулов по 5 особей в каждом, и признак выявлен только в двух пулах, то разброс оценки уровня признака в популяции составит 0.2–17.6%. Этот результат получен на основе доверительных интервалов, как если бы мы имели дело с выборкой индивидуальных образцов (то есть крайние значения доверительных интервалов для результатов 2% и 10%). Для более строгой оценки результатов анализа пулов, особенно если размер пулов варьирует, читатель может обратиться к специальной литературе (Bhattacharyya et al., 1979; Walter et al., 1980; Gu et al., 2003; Ebert et al., 2010). Стоит учитывать в дизайне исследования, что использование пулов может мешать получению релевантного результата при секвенировании ДНК, поскольку генетический материал может оказаться неоднородным.

Экстракция ДНК

В современной научной литературе описано множество различных методик экстракции ДНК из членистоногих, которые можно разделить на три категории. Первая группа методов подразумевает разрушение образца, выделение и последующую очистку ДНК. Здесь используются различные химические реагенты, процедура работы относительно других подходов длительна и трудоемка, а в ходе очистки происходят большие потери ДНК. Однако качество такой ДНК наиболее высоко и ее можно длительно (годами) хранить (Hajibabaei et al., 2005). Эти методы универсальны по отношению к образцам разного типа хранения, а также могут использоваться для свежесобранного материала. Ко второй группе относятся методы, подразумевающие разрушение образца и экстракцию ДНК в раствор, но без проведения какой-либо очистки. Преимущество этого подхода – сокращение потерь материала и экономия времени, однако обычно это не подразумевает длительного хранения ДНК. Эти методики могут быть использованы в полевых условиях для анализа свежесобранного материала без дальнейшего его хранения, а также для экспресс-проверок материала. Третья группа методов – «высвобождение» ДНК (DNA release), где выделение происходит без разрушения образца (Hunter et al., 2008; Lawrence et al., 2014; Asghar et al., 2015). Количество получаемой ДНК здесь низкое, но важно, что можно сохранить материал для морфологического анализа. Эти методы актуальны при работе с коллекционными и музейными образцами, в частности, при проведении штрих-кодирования образцов коллекции.

В рамках первой группы методов часто прибегают к «высаливанию» (salting out) – методике, основанной на том, что при высокой ионной силе белки выпадают в осадок, а ДНК остается в растворе и затем осаждается спиртом (Aljanabi, Martinez, 1997). В качестве примера можно привести следующие компоненты и порядок процесса выделения и очистки ДНК. Образец гомогенизируют в буфере, содержащем NaCl, ЭДТА для связывания двухвалентных катионов и ингибирования нуклеаз, Трис, поддерживающий буферные свойства, а также детергент, разрушающий мембраны и связывающийся с белками (SDS, СТАВ, DEPS и др.). Конечные концентрации компонентов в экстрагирующем буфере могут заметно варьировать, что зависит от того, происходит ли высаливание во время экстракции или после (Liu et al., 2000; Rivero et

al., 2006; Lagisz et al., 2010a; Ilinsky, 2013; Tian, Yu, 2013; Nguyen et al. 2017; Yudina et al., 2019; Wang, Wang, 2012; Asghar et al., 2015; Быков и др., 2020). Гомогенат инкубируют обычно при температурах от 37°C до 60°C, при этом чем ниже температура, тем дольше инкубация, хотя и здесь бывают вариации (Lagisz et al., 2010a; Vykov et al., 2020). Для длительно хранившегося материала желательно добавлять в экстрагирующий буфер протеиназу К. После экстракции ДНК высаливают, либо, если белки уже осадили, можно провести фенол-хлороформную или только хлороформную очистку (Liu et al., 2000; Rivero et al., 2006; Asghar et al., 2015; Hosseininia et al., 2019). Далее проводят осаждение ДНК, обычно этанолом или изопропанолом, и растворяют в воде или в ТЕ-буфере. Отметим, что существует большое количество коммерческих наборов, применяемых для выделения ДНК из членистоногих, например, prepGEM (MicroGEM International PLC), Gentra Puregene Kit (QIAGEN), DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN) и другие (Hajibabaei et al., 2005; Castalanelli et al., 2010; Asghar et al., 2015; Ball, Armstrong, 2014; Nguyen et al., 2017).

Примеры второй и третьей группы методов, подразумевающих выделение ДНК без её очистки, в литературе часто связаны с ключевым словом «прямая ПЦР» (direct PCR). Ярким примером такого рода протоколов служит двухминутная пробоподготовка образца в PBS-буфере для последующего штрих-кодирования (Thongjued et al., 2019). Часто, в том числе и нашей группой, используется STE-буфер (Pace et al., 1977; Li et al., 2011; Wang, Wang, 2012; Hosseininia et al., 2019; Williams et al., 2021). В данном случае после гомогенизации в буфере, содержащем только NaCl, Трис-НСl и ЭДТА (с опциональным добавлением протеиназы К), и инкубации при 37°C в течение 30 мин раствор может быть использован для ПЦР или помещен на длительное хранение при -20°C (Hosseininia et al., 2019). Используют ионообменную смолу Chelex® 100 в разных вариантах методики (Wang, Wang, 2012; Asghar et al., 2015; Miura et al., 2017). Общая схема заключается в гомогенизации образцов в 5–20% водной суспензии смолы Chelex® 100 с добавлением протеиназы К и инкубации при 65°C в течение часа (Wang, Wang, 2012), после чего раствор можно использовать для ПЦР.

Пример получения ДНК без физического разрушения экземпляра насекомого – обработка ультразвуком образца,

помещенного в пробирку с водой (Hunter et al., 2008). Еще один метод, позволяющий сохранить целостность образца, включает в себя длительную (16–20 часов) инкубацию насекомого в пробирке с буфером, содержащим SDS, CaCl₂ и NaCl, ДТТ, Трис и протеиназу К (Gilbert et al., 2007). В этом случае ДНК требует очистки, поскольку SDS ингибирует ПЦР, но сам экземпляр насекомого дегидратируют в абсолютном этаноле и возвращают в коллекцию. Отмечается, что успешное применение прямой ПЦР затрудняется для насекомых, имеющих сильно склеротизированные покровы или большое количество экзокринных желез (Wong et al., 2014).

Кроме использования целых экземпляров членистоногих, успешно выделяют ДНК из отдельных частей насекомого. Зачастую удобны в работе ноги, поскольку содержат

много мышечной ткани, нет компонентов пищеварительной системы, они быстро высыхают, что позволяет сохранить ДНК хорошего качества. Также используют экзувий, крылья, остатки оболочки яиц после выхода личинок и т.д. (Gregory, Rinderer, 2004; Dhananjeyan et al., 2010; Nguyen et al., 2017; Yumoto et al., 2021). Самый сложный из перечисленных здесь объектов – экзувий, поскольку шкурки имеют внеклеточное происхождение и несут на своей поверхности лишь небольшое количество эпителиальных клеток, а значит содержат крайне мало ДНК. Это обстоятельство требует оптимизации протокола, и Kranzfelder с соавт. (2017) пришли к выводу, что наилучшее решение – это использование некоторых коммерческих наборов выделения ДНК, тогда как обычные экстрагирующие буферы и протоколы малоэффективны.

Проверка качества выделения ДНК

Перед проведением ПЦР-анализа необходимо убедиться в том, что количество и качество выделенной ДНК достаточны для успешного проведения реакции. Есть три основных подхода: 1) ПЦР с универсальными праймерами к генам насекомых, который, в случае положительного результата, позволяет перейти к анализу, заложенному в дизайне исследования; 2) спектрофотометрический анализ, который позволяет оценить количество и чистоту образца ДНК; 3) электрофорез геномной ДНК для оценки количества и фрагментированности ДНК.

Первый подход, ПЦР с универсальными праймерами, может быть также включен в исследовательскую задачу. Например, если в дизайне исследования заложено проведение штрих-кодирования, то ампликон баркодирующего

района гена *COI* (субъединица I митохондриальной цитохром с-оксидазы), полученный с универсальных праймеров в ходе тестирования образца, может быть использован для секвенирования. Универсальные праймеры, часто используемые в исследованиях насекомых, представлены в Таблице 1. Важно учитывать, что при работе с объектами из разных отрядов насекомых зачастую требуется оптимизация температуры отжига универсальных праймеров. Кроме того, необходимо отметить, что, несмотря на заявленную «универсальность», праймеры могут оказаться неподходящими к отдельным группам беспозвоночных. В этом случае есть смысл ознакомиться с работами, где проводили модификацию праймеров, например Geller et al (2013).

Таблица 1. Последовательности используемых универсальных праймеров на гены насекомых для постановки ПЦР

Лocus, наименование праймера, (направление)	5'-3' последовательность праймера, (источник)	Размер ампликона, п.н.	t отжига*, °C
<i>COI</i> , C1-J-1718, (прямой)	GGAGGATTTGGAAATTGATTAGTTCC (Simon et al., 1994)	590 (в паре с HCO2198)	55
<i>COI</i> , LCO1490 (прямой)	GGTCAACAATCATAAAGATATTGG (Vrijenhoek, 1994)	710	48–59*
<i>COI</i> , HCO2198 (обратный)	TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA (Vrijenhoek, 1994)		
<i>28S rRNA</i> , 28SF1 (прямой)	TACCGTGAGGGAAAGTTGAAA (Choudhury, Werren, 2006)	456	54–55
<i>28S rRNA</i> , 28SR1 (обратный)	AGACTCCTTGGTCCGTGTTT (Choudhury, Werren, 2006)		

* оптимальная температура отжига может варьировать в зависимости от объекта исследования.

Table 1. Sequences of universal primers for detecting insect genes using PCR

Locus, primer name (direction)	5'-3' primer sequence (source)	Amplicon size, bp	Annealing t, °C
<i>COI</i> , C1-J-1718 (forward)	GGAGGATTTGGAAATTGATTAGTTCC (Simon et al., 1994)	590 (в паре с HCO2198)	55
<i>COI</i> , LCO1490 (forward)	GGTCAACAATCATAAAGATATTGG (Vrijenhoek, 1994)	710	48–59*
<i>COI</i> , HCO2198 (reverse)	TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA (Vrijenhoek, 1994)		
<i>28S rRNA</i> , 28SF1 (forward)	TACCGTGAGGGAAAGTTGAAA (Choudhury, Werren, 2006)	456	54–55
<i>28S rRNA</i> , 28SR1 (reverse)	AGACTCCTTGGTCCGTGTTT (Choudhury, Werren, 2006)		

* Optimal annealing temperature may vary depending on objects of investigation.

Если яркость свечения ампликона на агарозном геле слабая или сигнал вовсе отсутствует, желательно убедиться, что ДНК не была потеряна в процессе очистки. С другой стороны, высокие концентрации ДНК (>1мкг/мкл) могут ингибировать ПЦР или будут приводить к образованию неспецифических продуктов. В этом случае рекомендуется разведение ДНК до меньших концентраций (20–100 нг/мкл). При этом также произойдет разбавление возможных ингибиторов реакции и увеличится показатель чистоты ДНК. Так, в схеме выделения ДНК без последующей очистки из листоблошки *Bactericera cockerelli* – переносчика бактерий, вызывающих заболевание «зебра» у картофеля (zebra chip), авторы обнаружили, что для успешной амплификации получаемый раствор ДНК надо разбавлять в 100 раз (Levy et al., 2013).

Для определения концентрации ДНК в образце можно воспользоваться методом спектрофотометрии, который позволяет провести количественную оценку содержания ДНК в образце, а также определить чистоту выделенной ДНК. Важно, что для измерения требуется малое количество материала (1–2 мкл). О присутствии посторонних примесей свидетельствует соотношение показателей поглощения длин волн на 260 нм, 280 нм ($A_{260/280}$), и 230 нм ($A_{260/230}$). Считается, что оптимальный диапазон значений составляет 1.8–2.0 для $A_{260/280}$ и 2.3–2.4 для $A_{260/230}$ (Armbrecht, 2013; Koetsier, Cantor, 2019). Более низкие значения $A_{260/280}$ указывают на присутствие белков и фенолов, более высокие – на присутствие РНК. Показатель $A_{260/230}$ более чувствителен к посторонним веществам (Armbrecht, 2013; Koetsier, Cantor, 2019), и указывает на присутствие в образце хаотропных солей, ЭДТА, а также детергентов Тритон-Х100, Твин-20, некоторых белков и фенолов.

Еще один метод проверки качества ДНК – электрофорез в 0.5–1.0% агарозном геле. По электрофоретическому профилю геномной ДНК можно оценить как относительную концентрацию ДНК в пробе, сравнивая со свечением дорожки маркера молекулярных масс или контроля с заранее известной концентрации, так и ее целостность: представлен ли мажорный компонент высокомолекулярной фракцией или значительное количество ДНК фрагментировано. Присутствие «шмеров» (размазанные нечеткие полосы ДНК, от английской smear – мазок, размазывать) свидетельствует о ее разрушении, а степень фрагментации можно определить по положению шмера относительно

маркера. Если фракция шмера тяжелее уровня маркера 2 т.п.н, то амплификация небольшого целевого продукта, скорее всего, пройдет успешно (Lin, 2012). Рекомендуемые значения концентрации агарозы в геле для разделения ДНК считаются следующими: 0.5% для 1.0–30.0 т.п.н.; 0.75% – 0.8–12.0 т.п.н.; 1.0% – 0.5–10.0 т.п.н. (Поляничко, 2007). Однако, обычно для геномного электрофореза мы используем 0.7%-ный гель, так как при более низкой плотности увеличивается вероятность его механического повреждения, во избежание чего необходимо дополнительно делать подложку из геля с более высокой концентрацией агарозы. Недостатки этого метода заключаются в больших затратах времени и расхода ДНК (5–20 мкл) и в необходимости использования образцов с высокой концентрацией ДНК.

Если при отсутствии амплификации качество и количество ДНК по результатам спектрофотометрии и/или геномного электрофореза удовлетворительны, следует проверить условия ПЦР, изменить набор праймеров, провести переосаждение ДНК. Увеличение объема реакционной смеси, как правило, хорошо сказывается на результате ПЦР, однако при работе с большими выборками это не экономично. Как было указано выше, если концентрации ДНК высокие, то следует разбавить образец в 10, 100, а иногда и в 1000 раз. Если исследователь подозревает присутствие в образце ингибиторов ПЦР, то это можно проверить, повторив ПЦР со смесью ДНК проблемного образца и ДНК положительного контроля в соотношении объемов 9 (проблемный образец): 1 (контроль) и 1:1 (с учетом концентрации ДНК). Если продукт не нарабатался ни в одном из этих вариантов, можно заключить, что в образце содержатся ингибиторы ПЦР. Следовательно, необходимо развести образец, провести переосаждение, очистку с использованием коммерческого набора либо повторную экстракцию ДНК (возможно, другим методом). Если продукт не синтезировался при разведении 9:1, но есть при разведении 1:1, значит, в образце присутствуют ингибиторы, эффективность которых снижается при его разведении. В этом случае для проблемной ДНК можно подобрать разведение, при котором ПЦР пройдет успешно. Если продукт получен в обоих разведениях, то здесь, вероятно, проблема заключается в неоптимальном подборе праймеров и условий для ПЦР, которые необходимо пересмотреть, ориентируясь на объект исследования.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР)

ПЦР – это базовый метод молекулярно-генетического анализа, который позволяет получать препаративное количество интересующего участка ДНК путем многократного копирования генетического материала ферментом ДНК-зависимой ДНК-полимеразой с исследуемого участка ДНК, с которым комплементарно гибридизуются два праймера (искусственно синтезированные короткие цепи олигонуклеотидов). В качестве материала для синтеза используются дезоксинуклеотид-трифосфаты, необходимым катализатором выступают ионы Mg^{2+} (Патрушев, 2004; Pelt-Verkuil et al., 2008). На рынке представлены разнообразные коммерческие смеси для проведения ПЦР, которые позволяют уменьшить вероятность контаминации и снижают трудозатраты. Существует целый набор техник ПЦР, позволяющих решать специфические задачи. Самая

простая схема ПЦР, подразумевающая получение ампликона с одной парой праймеров в режиме одного профиля условий реакции, называется **конвенциональной или стандартной ПЦР**. **Мультиплексная** (множественная, мультипраймерная) **ПЦР** подразумевает использование смеси двух и более пар праймеров для одновременного анализа нескольких локусов (Mahony et al., 1995; Nenegariu et al., 1997; Патрушев, 2004). Применение этого подхода позволяет сократить затраты труда и времени, когда набор образцов нужно проанализировать на несколько признаков. Так, за одну реакцию можно провести проверку качества ДНК и выявить целевой объект (Илинский, Захаров, 2007), например, присутствие грибной инфекции, микроспоридий, бактерий, вирусов или осуществить наработку нескольких продуктов для секвенирования. Параметры

реакционной смеси могут быть аналогичны конвенциональной ПЦР, однако может потребоваться значительная работа по оптимизации реакции. Особое внимание необходимо уделить подбору праймеров, их относительной концентрации, а также концентрации ПЦР буфера, отношению катионов магния и дезоксирибонуклеотид-трифосфатов (Henegariu et al., 1997; Markoulatos et al., 2002). Кроме того, оптимизация может потребоваться не только для температуры отжига смеси праймеров, но и для температуры элонгации. В ряде случаев выход продукта увеличивается при снижении этого параметра до 65 °С (Henegariu et al., 1997). **Гнездовая ПЦР** (nested PCR) позволяет усилить разрешающую способность анализа, например, при низком качестве/количестве выделенной ДНК, низком титре патогена, или когда надо избавиться от неспецифических продуктов (Патрушев, 2004; Pelt-Verkuil et al., 2008; Arthofer et al., 2009; Вуков et al., 2020). Этот вариант состоит из двух последовательных ПЦР, первый раунд включает 10–15 циклов амплификации локуса с внешними праймерами к геномной ДНК, второй – 25–30 циклов с использованием «внутренних» праймеров, а в качестве матрицы – ампликон с первого этапа. Отметим, что гнездовая ПЦР весьма чувствительна к контаминации малых количеств сторонней ДНК, то есть высока опасность ложно-положительного результата. **Количественная ПЦР** (qPCR) или ПЦР в реальном времени (Real-time PCR) – технология, позволяющая автоматически определять не только присутствие целевого продукта (последовательности) в образце, но и измерять количество исходных копий. Количество наработанной ДНК измеряется после каждого цикла амплификации с помощью интеркалирующих флуоресцентных красителей или специальных олигонуклеотидных зондов. С помощью красителя, флуоресценция которого увеличивается пропорционально количеству амплифицированной ДНК, можно проводить количественное определение в «реальном времени», а наличие зондов позволяет обнаружить сразу несколько продуктов ПЦР в одном образце. Технология количественной ПЦР имеет множество преимуществ относительно «классической» ПЦР, в частности, позволяет оценить экспрессию генов (Russell et al., 1992; Патрушев, 2004; Mackay, 2004; Arya et al., 2005; Rebrikov, Trofimov, 2006; Ребриков и др., 2009), пригодность ДНК для ПЦР по данным кривых плавления (т.е. не требуется проводить электрофорез), нагрузку патогена или симбионта (Bell et al., 2009; Вуков et al., 2020; Maheshwari et al., 2021) и даже определить пол насекомого (Belousova et al., 2019). Еще один вариант количественной ПЦР, который пока не нашел широкого применения в исследованиях насекомых по причине высокой стоимости – это **капельная цифровая ПЦР** (ддПЦР, droplet digital PCR). Этот метод более точный в количественных оценках, поскольку подразумевает, что реакционная смесь разделяется в одной пробирке на 15–20 тысяч микрообъемов (капель), в каждом из которых реакция идет независимо, и результат реакции оценивается по финальной точке. Прибор оценивает количество капель и определяет, где реакция прошла, а где – нет. Подразумевается, что в тех микрокаплях, в которые попала целевая ДНК, сигнал будет положительным, а в которые не попала – отрицательным (Hindson et al., 2011; Sofronova et al., 2016). Примеров применения этого подхода в исследованиях по

защите растений не так много по причине, как минимум, высокой стоимости анализа. Здесь приведем два примера, где удалось значительно увеличить разрешающую способность анализа, что в конечном итоге может окупить затраты применения ддПЦР. Американским исследователям (Zink et al., 2017) удалось разработать протокол детекции генетического материала хлопковой совки (*Helicoverpa armigera*) из сборов клеевых ловушек против тысячекратно превосходящего количества сигнала от американской кукурузной совки (*Helicoverpa zea*). Эффективная детекция телиоспор *Tilletia controversa* (возбудитель карликовой головни пшеницы) в почве крайне трудна даже с применением молекулярно-генетических методов. Однако разработанный протокол на основе ддПЦР позволил в 100 раз увеличить чувствительность анализа по сравнению с конвенциональной ПЦР и в 4 раза по сравнению с ПЦР в реальном времени (Liu et al., 2020). Далее подробнее остановимся на применении разных ПЦР подходов для решения частных задач.

Музеи хранят ценные экземпляры насекомых, однако их использование для работы с ДНК крайне ограничено, поскольку качество получаемой ДНК, обычно, низкое (Lalonde, Marcus, 2020). В попытке расширить возможности использования музейных экземпляров разрабатываются специальные подходы, основанные на ПЦР. Одна из успешных методик – использование полугнездового подхода, когда баркодирующий участок разбивается на два участка и нарабатывается двумя раундами ПЦР с вырожденными праймерами, у которых на 5' конце расположена последовательность M13 (Mitchell 2015). Требуется четыре реакции, в результате которых получается два перекрывающихся участка гена *COI*, общей длиной 559 п.н. Далее эти участки можно секвенировать с праймеров M13. Разработанные в упомянутой работе праймеры должны подходить для широкого круга насекомых, включая жесткокрылых, чешуекрылых, двукрылых, полужесткокрылых, стрекоз и, как полагает автор, многих других групп насекомых. В отношении возраста образцов, эффективность подхода на модельных образцах жесткокрылых и чешуекрылых составляла 67% для образцов, хранящихся в музее до 25 лет и 51% – 26–55 лет.

Разработка методов детекции инфекций на основе ПЦР остается актуальной задачей на протяжении десятилетий. Двадцать лет назад были предложены протоколы гнездовой ПЦР для выявления фитоплазм – патогенов растений, переносимых насекомыми, и схемы рестрикционного анализа для диагностики патогена (Gundersen, Lee, 1996; Harrison et al., 2002), которые остаются актуальными и в настоящее время (Hernandez et al., 2020). Действительно, фитопlasма до молекулярной эры была трудноуловима для исследователей, ее проблематично культивировать и затруднительно различать разные изоляты по фенотипу (морфология, хозяин, течение патогенного процесса). С развитием техники микроскопии и молекулярных методов диагностики наука узнала о широком распространении микроорганизмов, не проявляющих явные патогенные свойства. Например, давно известны такие бактерии, как *Buchera* и *Wigglesworthia*, обеспечивающие своим хозяевам (тля и муха це-це, соответственно) метаболическую комплементацию. Однако и сейчас выявляются новые представители облигатных симбиотических

бактерий. Так, в 2020 году появилось сообщение о *Candidatus Symbioecobacterium* у нематоды подотряда Tylenchina, которая необходима хозяину для инфицирования насекомых (Martinson et al., 2020).

Задачи по выявлению и идентификации симбионтов насекомых часто возникают не только в фундаментальных исследованиях, но и в производстве. Так корейские специалисты для коммерческих ферм по разведению пластинчатых жуков *Protaetia brevitarsis* и *Allomyrina dichotoma* разработали мультиплексную систему (Kwak et al., 2015), которая позволяла выявлять в одной реакции грибные инфекции *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, бактерии *Bacillus thuringiensis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens* и нудивирус *Oryctes rhinoceros*. Кроме того, авторы использовали систему капиллярного электрофореза для количественной оценки инфекций. Важно, что в таких практических приложениях круг актуальных инфекций очерчен, поэтому и результат разработок оказывается востребован. Другой пример – выявление микроспоридий в медицинской практике методом ПЦР в реальном времени, где видовая принадлежность устанавливается по кривой плавления продуктов реакции (Polley et al., 2011). Разработка такого подхода для анализа популяций, лабораторных или промышленных культур насекомых перспективна, поскольку может значительно увеличить эффективность диагностики и снизить трудозатраты в сравнении с традиционным подходом, основанным на световой микроскопии. Примером здесь может служить выявление микроспоридий и различных вирусов (бакуловirusы, парвовirusы) у таких экономически значимых насекомых, как *Apis mellifera*, *Bombus terrestris*, китайский дубовый шелкопряд *Antheraea pernyi*, тутовый шелкопряд *Bombyx mori* (Erler et al., 2012; Wu et al., 2017; Li et al., 2019). Разработка протоколов секвенирования следующего поколения (NGS) позволяет одновременно (параллельное секвенирование) выявлять как разнообразие микроспоридий, так и устанавливать видовую принадлежность хозяев (Trzebny et al., 2020). Кроме того, эти протоколы позволяют обнаруживать ранее неописанное (криптическое) разнообразие патогенов, что особенно важно в случаях микс-инфекции микроспоридий (Trzebny et al., 2020), а среди массовых видов мелких двукрылых – выявлять редкие виды (Meier et al., 2015).

Один из существенных недостатков большинства методов NGS – короткие прочтения, менее 500 п.н., которые требуется перекрывать с другими фрагментами для получения более длинных участков, используя биоинформационные подходы. В результате нередко получаются химерные последовательности или теряется часть информации о нуклеотидной последовательности гена. Для решения этой проблемы предложен модифицированный подход, подразумевающий секвенирование нескольких локусов, амплифицированных в результате трехшаговой гнездовой ПЦР, с помощью которой, в частности, получена хорошая воспроизводимость на музейных экземплярах пчел, хранившихся до пяти лет на энтомологических булавках и фиксированных в спирте (Akankunda et al., 2020).

Выяснение роли полифагов, а именно их пищевого рациона в экосистеме, также может успешно решаться применением ПЦР. Извлечение содержимого кишечника насекомого, выделение ДНК и скрининг ДНК растений

позволяет идентифицировать его пищевые предпочтения. В модельном эксперименте исследователи генотипировали эталонную коллекцию растений по гену большой субъединицы рибулозобифосфаткарбоксилазы (Matheson et al., 2008). Представителей восьми семейств насекомых собрали с растений, выделили ДНК из пищеварительной системы и секвенированием по Сенгеру определили присутствие ДНК конкретных видов растений. Авторы отмечают, что в тестах на сверчках ДНК растения удавалось выявить в течение 12 часов после последнего приема пищи насекомыми (Matheson et al., 2008). Кроме того, поскольку авторы в эксперименте отдельно отмечают, что собранных насекомых оставляли на тех растениях, на которых их нашли до непосредственных экспериментальных процедур (чтобы избежать смешения разной ДНК), то именно технологии NGS необходимы для данного рода исследований. Отметим, что исследования пищевого поведения по схожей схеме применяются и для хищных насекомых (Китаев и др., 2011).

Зачастую схема исследования требует идентификацию пола особи. Традиционный морфологический подход может оказаться затруднительным или даже невозможным в случае слабого полового диморфизма или использования личиночных стадий насекомого. Для кариологического метода надо использовать живые клетки, что также в большинстве случаев невозможно в рамках конкретного эксперимента, не говоря уже о высокой трудоемкости подхода и высоких профессиональных требованиях к оператору. Напротив, молекулярно-генетический подход позволяет анализировать постмортальный и личиночный материал, кроме того можно использовать экзувий, порцию гемолимфы или отдельные яйца насекомого, а сам анализ легко масштабируется. Так, для некоторых видов чешуекрылых (*Bombyx mori*, *Cydia pomonella*, *Lobesia botrana*, *Ostrinia nubilalis*) были разработаны методы идентификации пола по молекулярно-генетической детекции W-хромосомы (Abe et al., 1998; Aguirre et al., 2020; Coates and Hellmich, 2003; Fuková et al., 2009). Напомним, что у чешуекрылых самцы гомогаметны (ZZ), а самки гетерогаметны (ZW или Z0). На основе выявления полоспецифической хромосомы Y основывались и методы определения пола малого булавоусого хрущака *Tribolium castaneum* (Lagisz et al., 2010b), комаров рода *Anopheles* (Krzywinski et al., 2004; Hall et al., 2013), клопа *Rhodnius proximus* (Koerich et al., 2016), плодовой мушки *Drosophila melanogaster* (Carvalho and Clark, 2013). При этом подходе подразумевается, что в отсутствие полоспецифической хромосомы (Y или W) отсутствует и ПЦР-продукт. Однако, этот результат может быть ложно-отрицательным, что приведет к неправильному выводу. Причина ложно-отрицательного результата может быть от банальной технической ошибки, до отсутствия последовательности в хромосоме вследствие делеции. Учитывая высокую вариабельность полоспецифических хромосом, такая ситуация может возникнуть даже на уровне популяции вида. Чтобы преодолеть эту проблему, а также, что еще более важно, реализовать в отношении чешуекрылых универсальный подход определения пола, был предложен метод оценки соотношения однокопийного аутосомального гена к однокопийному гену, сцепленному с полом (т.е. гену, локализованному в Z хромосоме) методом PCR (Belousova et al., 2019). Универсальность

подхода реализуется в свете использования праймеров к белок-кодирующим генам, которые фактически находятся под значительно более строгим отбором, нежели некодирующие последовательности, использованные в ряде работ, а также в том, что синтения Z-хромосомы довольно

консервативна, по сравнению с W-хромосомой. В результате этот метод был успешно опробован на чешуекрылых разных семейств, при этом использовалась одна и та же пара праймеров, специфичных к гену, сцепленному с полом.

Заключение

Активно развивающиеся методы, основанные на ПЦР, открывают большие возможности для исследователей, позволяя решать более сложные фундаментальные и

прикладные вопросы. Музейные образцы, ранее казавшиеся недоступными для молекулярно-генетического исследования, все чаще становятся объектами ДНК анализа.

Авторы выражают благодарность анонимным рецензентам, а также членам редколлегии журнала Алёхину А.В. и Шамшеву И.В. за ценные замечания при чтении рукописи.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 19-04-00983, БП № 121031800061-7.

Библиографический список (References)

- Быков РА, Юрлова ГВ, Деменкова МА, Дубатовов ВВ, Керчев ИА и др. (2020) Высокий уровень встречаемости эндосимбионта *Wolbachia* в популяциях сибирского шелкопряда *Dendrolimus superans sibiricus* Tschetverikov, 1908 (Lepidoptera: Lasiocampidae) на территории России. *Журнал общей биологии* 81(5):387–393.
- Голуб ВБ, Цуриков МН, Прокин АА (2021) Коллекции насекомых: сбор, обработка и хранение материала. М.: Товарищество научных изданий КМК. 385 с.
- Гржибовский АМ (2008) Доверительные интервалы для частот и долей. *Экология человека* 5:57–60.
- Китаев КА, Удалов МБ, Беньковская ГВ (2011) Молекулярно-генетические методы анализа хищничества среди насекомых в агроценозах. *Экологическая генетика* 9(4):15–24 <https://doi.org/10.17816/ecogen9415-24>
- Поляничко АМ (2007) Электрофорез в агарозном геле. Санкт-Петербург: СПбГУ. 43 с.
- Рибриков ДВ, Саматов ГА, Трофимов ДЮ, Семенов ПА, Савилова АМ и др (2009) ПЦР «в реальном времени». М.: БИНОМ. Лаборатория знания. 223 с.
- Abe H, Kanehara M, Terada T., Ohbayashi, F., Shimada, T., et al. (1998). Identification of novel random amplified polymorphic DNAs (RAPDs) on the W chromosome of the domesticated silkworm, *Bombyx mori*, and the wild silkworm, *B. mandarina*, and their retrotransposable element-related nucleotide sequences. *Genes Genet Syst* 73:243–254. <https://doi.org/10.1266/ggs.73.243>
- Agresti A, Coull BA (1998) Approximate is better than “exact” for interval estimation of binomial proportions. *The American Statistician* 52(2):119–126. <https://doi.org/10.1080/00031305.1998.10480550>
- Aguirre C, Olivares N, Hinrichsen P (2020) An Efficient Duplex PCR Method for Sex Identification of the European Grapevine Moth *Lobesia botrana* (Lepidoptera: Tortricidae) at Any Developmental Stage. *J Econ Entomol* 113(5):2505–2510. <https://doi.org/10.1093/jee/toaa155>
- Akankunda T, To H, Rodriguez Lopez C, Leijts R, Hogendoorn K (2020) A method to generate multilocus barcodes of pinned insect specimens using MiSeq. *Mol Ecol Resour* 20(3):692–705. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13143>
- Aljanabi SM, Martinez I (1997) Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucl Acids Res* 25(22):4692–4693. <https://doi.org/10.1093/nar/25.22.4692>
- Arya M, Shergill IS, Williamson M, Gommersall L, Arya N, et al. (2005) Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert Rev Mol Diagn* 5(2):209–219. <https://doi.org/10.1586/14737159.5.2.209>
- Armbrecht M, Eppendorf AG (2013) Detection of contamination in DNA and protein samples by photometric measurements. *Application Note* 279.
- Asgar U, Malik MF, Anwar F, Javed A, Raza A (2015) DNA extraction from insects by using different techniques: a review. *Adv Entomol* 3(04): 132. <https://doi.org/10.4236/ae.2015.34016>
- Ball SL, Armstrong KF (2014) Rapid, one-step DNA extraction for insect pest identification by using DNA barcodes. *J Econ Entomol* 101(2):523–532. <https://doi.org/10.1093/jee/101.2.523>
- Bell AS, Blanford S, Jenkins N, Thomas MB, Read AF (2009). Real-time quantitative PCR for analysis of candidate fungal biopesticides against malaria: technique validation and first applications. *J Invertebr Pathol* 100(3):160–168. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2009.01.006>
- Bhattacharyya GK, Karandinos MG, DeFoliart GR (1979) Point estimates and confidence intervals for infection rates using pooled organisms in epidemiologic studies. *Am J Epidemiol* 109(2):124–131. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a112667>
- Bykov R, Kerchev I, Demenkova M, Ryabinin A, Ilinsky Y (2020). Sex-Specific *Wolbachia* Infection Patterns in Populations of *Polygraphus proximus* Blandford (Coleoptera; Curculionidae: Scolytinae). *Insects* 11(8): 547. <https://doi.org/10.3390/insects11080547>
- Carvalho AB, Clark AG (2013) Efficient identification of Y chromosome sequences in the human and *Drosophila* genomes. *Genome Res* 23:1894–1907. <https://doi.org/10.1101/gr.156034.113>
- Castalanelli MA, Severtson DL, Brumley CJ, Szito A, Footitt RG, et al (2010) A rapid non-destructive DNA extraction method for insects and other arthropods. *J Asia Pac Entomol* 13(3):243–248. <https://doi.org/10.1016/j.aspen.2010.04.003>
- Choudhury R, Werren JH (2006) Troi.cc.rochester.edu Unpublished primers. <http://troi.cc.rochester.edu/~wolb/FIBR/downloads.htm>. (07 июля 2021).
- Clopper CJ, Pearson ES (1934) The use of confidence or fiducial limits illustrated in the case of the binomial. *Biometrika* 404–413. <https://doi.org/10.2307/2331986>
- Coates BS, Hellmich RL (2003) Two sex-chromosome-linked microsatellite loci show geographic variance among North American *Ostrinia nubilalis*. *J Insect Sci* 3: 29. <https://doi.org/10.1093/jis/3.1.29>

- Dhananjeyan KJ, Paramasivan R, Tewari SC, Rajendran R, Thenmozhi V, et al. (2010) Molecular identification of mosquito vectors using genomic DNA isolated from eggshells, larval and pupal exuvium. *Trop Biomed* 27(1):47–53.
- Dillon N, Austin AD, Bartowsky E (1996) Comparison of preservation techniques for DNA extraction from hymenopterous insects. *Insect Mol Biol* 5(1):21–24. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.1996.tb00036.x>
- Dodge C, Coolidge J, Cooperband M, Cossé A, Carrillo D, et al. (2017) Quercivorol as a lure for the polyphagous and Kuroshio shot hole borers, *Euwallacea* spp. nr. *fornicatus* (Coleoptera: Scolytinae), vectors of *Fusarium dieback*. *PeerJ* 5: e3656. <https://doi.org/10.7717/peerj.3656>
- Ebert TA, Brilansky R, Rogers M. (2010) Reexamining the pooled sampling approach for estimating prevalence of infected insect vectors. *Ann Entomol Soc Am* 103(6):827–837. <https://doi.org/10.1603/AN09158>
- Erler S, Lommatzsch S, Lattorff HMG (2012) Comparative analysis of detection limits and specificity of molecular diagnostic markers for three pathogens (Microsporidia, *Nosema* spp.) in the key pollinators *Apis mellifera* and *Bombus terrestris*. *Parasitol Res* 110(4):1403–1410. <https://doi.org/10.1007/s00436-011-2640-9>
- Fukatsu T (1999) Acetone preservation: a practical technique for molecular analysis. *Mol Ecol* 8(11):1935–1945. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294x.1999.00795.x>
- Ghobari H, Zamani H (2020) A review on DNA barcoding for identification of insects. *Iran J Biol* 1(2):52–64.
- Gilbert MTP, Moore W, Melchior L, Worobey M (2007) DNA extraction from dry museum beetles without conferring external morphological damage. *PLoS One* 2(3): e272. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000272>
- Gorokhova E (2005) Effects of preservation and storage of microcrustaceans in RNAlater on RNA and DNA degradation. *Limnol Oceanogr Meth* 3(2):143–148. <https://doi.org/10.4319/lom.2005.3.143>
- Gregory PG, Rinderer TE (2004) Non-destructive sources of DNA used to genotype honey bee (*Apis mellifera*) queens. *Entomol Exp Appl* 111(3):173–177. <https://doi.org/10.1111/j.0013-8703.2004.00164.x>
- Gu W, Lampman R, Novak RJ (2003) Problems in estimating mosquito infection rates using minimum infection rate. *J Med Entomol* 40(5):595–596. <https://doi.org/10.1603/0022-2585-40.5.595>
- Gundersen DE, Lee IM (1996) Ultrasensitive detection of phytoplasmas by nested-PCR assays using two universal primer pairs. *Phytopathol Mediterr* 144–151.
- Haile S, Corbett RD, Bilobram S, Bye MH, Kirk H, et al. (2019). Sources of erroneous sequences and artifact chimeric reads in next generation sequencing of genomic DNA from formalin-fixed paraffin-embedded samples. *Nucleic Acids Res* 47(2): e12–e12. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1142>
- Hajibabaei M, DeWaard JR, Ivanova NV, Ratnasingham S, Dooh RT, et al. (2005). Critical factors for assembling a high volume of DNA barcodes. *Philos TR Soc B* 360(1462):1959–1967. <https://doi.org/10.1098/rstb.2005.1727>
- Hale ML, Burg TM, Steeves TE (2012). Sampling for microsatellite-based population genetic studies: 25 to 30 individuals per population is enough to accurately estimate allele frequencies. *PLoS One* 7:e45170. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0045170>
- Harrison NA, Myrie W, Jones P, Carpio ML, Castillo M, et al. (2002) 16S rRNA interoperon sequence heterogeneity distinguishes strain populations of palm lethal yellowing phytoplasma in the Caribbean region. *Ann Appl Biol* 141(2):183–193. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.2002.tb00211.x>
- Hebert PD, Cywinska A, Ball SL, DeWaard JR (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 270(1512):313–321. <https://doi.org/10.1098/rspb.2002.2218>
- Hindson BJ, Ness KD, Masquelier DA, Belgrader P, Heredia NJ et al. (2011) High-throughput droplet digital PCR system for absolute quantitation of DNA copy number. *Anal Chem* 83(22):8604–8610. <https://doi.org/10.1021/ac202028g>
- Hosseini A, Khanjani M, Asadi M, Soltani J (2019). Comparison of five DNA extracting protocols from *Typhlodromus* (*Anthoseius*) *bagdasarjani* Wainsten and *Arutunjan* (Acari: Phytoseiidae). *Syst Appl Acarol* 24(7):1249–1260. <https://doi.org/10.11158/saa.24.7.9>
- Hunter SJ, Goodall TI, Walsh KA, Owen R, Day JC (2008) Nondestructive DNA extraction from blackflies (Diptera: Simuliidae): retaining voucher specimens for DNA barcoding projects. *Mol Ecol Resour* 8(1):56–61. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2007.01879.x>
- Ilinsky Y (2013) Coevolution of *Drosophila melanogaster* mtDNA and *Wolbachia* genotypes. *PLoS One* 8(1):e54373. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054373>
- Koerich LB, Dupim EG, Faria LL, Dias FA, Dias AF, et al. (2016) First report of Y-linked genes in the kissing bug *Rhodnius prolixus*. *BMC Genomics* 17:100. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-2425-8>
- Koetsier G, Cantor E (2019) A practical guide to analyzing nucleic acid concentration and purity with microvolume spectrophotometers. *New England Biolabs Inc.*
- Kranzfelder P, Ekrem T, Stur E (2016) Trace DNA from insect skins: a comparison of five extraction protocols and direct PCR on chironomid pupal exuviae. *Mol Ecol Resour* 16(1):353–363. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12446>
- Krzywinski J, Nusskern DR, Kern MK, Besansky NJ (2004) Isolation and characterization of Y chromosome sequences from the African malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *Genetics* 166:1291–1302. <https://doi.org/10.1534/genetics.166.3.1291>
- Kwak KW, Nam SH, Choi JY, Lee S, Kim HG, et al. (2015) Simultaneous detection of fungal, bacterial, and viral pathogens in insects by multiplex PCR and capillary electrophoresis. *J Industr Entomol* 30(2):64–74. <https://doi.org/10.7852/IJIE.2015.30.2.64>
- Lagisz M, Port G, Wolff K (2010a) A cost-effective, simple and high-throughput method for DNA extraction from insects. *Insect Sci* 17(5):465–470. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7917.2010.01318.x>
- Lagisz M, Wilde KE, Wolff K (2010b) The development of PCR-based markers for molecular sex identification in the model insect species *Tribolium castaneum*. *Entomol Exp Appl* 134(1):50–59. <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.2009.00935.x>

- Lalonde MM, Marcus JM (2020) How old can we go? Evaluating the age limit for effective DNA recovery from historical insect specimens. *Syst Entomol* 45(3):505–515. <https://doi.org/10.1111/syen.12411>
- Lawrence AL, Brown GK, Peters B, Spielman DS, Morin-Adeline V, et al. (2014) High phylogenetic diversity of the cat flea (*Ctenocephalides felis*) at two mitochondrial DNA markers. *Med Vet Entomol* 28(3):330–336.
- Lévy J, Hancock J, Ravindran A, Gross D, Tamborindeguy C, et al. (2013) Methods for Rapid and Effective PCR-Based Detection of ‘Candidatus *Liberibacter solanacearum*’ From the Insect Vector *Bactericera cockerelli*: Streamlining the DNA Extraction/Purification Process. *J Econ Entomol* 106(3):1440–1445. <https://doi.org/10.1603/EC12419>
- Li H, Xu H, Zhao C, Sulaiman Y, Wu C (2011) A PCR amplification method without DNA extraction. *Electrophoresis* 32(3-4):394–397. <https://doi.org/10.1002/elps.201000392>
- Lin P (2012) Genomic DNA QC Using Standard Gel Electrophoresis <https://jgi.doe.gov/wp-content/uploads/2014/02/Genomic-DNA-QC-2012.pdf>
- Li P, Mi R, Zhao R, Li X, Zhang B, et al. (2019) Quantitative real-time PCR with high-throughput automatable DNA preparation for molecular screening of *Nosema* spp. in *Antheraea pernyi*. *J Invertebr Pathol*, 164:16–22. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2019.04.003>
- Liu D, Coloe S, Baird R, Pedersen J (2000) Rapid mini-preparation of fungal DNA for PCR. *J Clin Microbiol* 38(1):471–471. <https://doi.org/10.1128/JCM.38.1.471-471.2000>
- Liu J, Li C, Muhae-Ud-Din G, Liu T, Chen W, et al. (2020) Development of the droplet digital PCR to detect the teliospores of *Tilletia controversa* Kühn in the soil with greatly enhanced sensitivity. *Front Microbiol* 11:4. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00004>
- Mackay IM (2004) Real-time PCR in the microbiology laboratory. *Clin Microbiol Infect* 10(3):190–212. <https://doi.org/10.1111/j.1198-743X.2004.00722.x>
- Maheshwari Y, Selvaraj V, Godfrey K, Hajeri S, Yokomi R (2021) Multiplex detection of “Candidatus *Liberibacter asiaticus*” and *Spiroplasma citri* by qPCR and droplet digital PCR. *PLoS one* 16(3):e0242392. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0242392>
- Mandrioli M, Borsatti F, Mola L (2006) Factors affecting DNA preservation from museum-collected lepidopteran specimens. *Entomol Exp Appl* 120(3):239–244. <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.2006.00451.x>
- Mandrioli M (2008) Insect collections and DNA analyses: how to manage collections? *Museum Manag Curatorship* 23(2):193–199. <https://doi.org/10.1080/09647770802012375>
- Mahony JB, Luinstra KE, Tyndall M, Sellors JW, Krepel J, et al. (1995). Multiplex PCR for detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* in genitourinary specimens. *J Clin Microbiol* 33(11):3049–3053. <https://doi.org/10.1128/jcm.33.11.3049-3053.1995>
- Martinson VG, Gawryluk RM, Gowen BE, Curtis CI, Jaenike J, et al. (2020). Multiple origins of obligate nematode and insect symbionts by a clade of bacteria closely related to plant pathogens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 117(50):31979–31986. <https://doi.org/10.1073/pnas.2000860117>
- Matheson CD, Muller GC, Junnila A, Vernon K, Hausmann A, et al. (2008) A PCR method for detection of plant meals from the guts of insects. *ORG DIVERS EVOL* 7(4):294–303. <https://doi.org/10.1016/j.ode.2006.09.002>
- Meier R, Wong W, Srivathsan A, Foo M (2016) \$1 DNA barcodes for reconstructing complex phenomes and finding rare species in specimen-rich samples. *Cladistics* 32(1):100–110. <https://doi.org/10.1111/cla.12115>
- Mitchell A (2015) Collecting in collections: a PCR strategy and primer set for DNA barcoding of decades-old dried museum specimens. *Mol Ecol Resour* 15(5):1102–1111. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12380>
- Miura K, Higashiura Y, Maeto K (2017) Evaluation of easy, non-destructive methods of DNA extraction from minute insects. *Appl Entomol Zool* 52(2):349–352. <https://doi.org/10.1007/s13355-017-0481-4>
- Moreau CS, Wray BD, Czekanski-Moir JE, Rubin BE (2013) DNA preservation: a test of commonly used preservatives for insects. *Invertebrate systematics* 27(1):81–86. <https://doi.org/10.1071/IS12067>
- Nagy ZT (2010) A hands-on overview of tissue preservation methods for molecular genetic analyses. *ORG DIVERSEVOL* 10(1):91–105. <https://doi.org/10.1007/s13127-010-0012-4>
- Nakahama N, Isagi Y, Ito M (2019) Methods for retaining well-preserved DNA with dried specimens of insects. *Eur J Entomol* 116:486–491. <http://hdl.handle.net/2433/245245>
- Nguyen HQ, Kim YI, Borzée A, Jang Y (2017) Efficient isolation method for high-quality genomic DNA from cicada exuviae. *Ecol Evol* 7(20):8161–8169. <https://doi.org/10.1002/ece3.3398>
- Pace NR, Walker TA, Schroeder E (1977) Structure of the 5.8 S RNA component of the 5.8 S-28S ribosomal RNA junction complex. *Biochemistry* 16(24):5321–5328. <https://doi.org/10.1021/bi00643a025>
- Peña-Llopis S, Brugarolas J (2013) Simultaneous isolation of high-quality DNA, RNA, miRNA and proteins from tissues for genomic applications. *Nat Protoc* 8(11):2240–2255. <https://doi.org/10.1038/nprot.2013.141>
- Polley SD, Boadi S, Watson J, Curry A, Chiodini PL (2011) Detection and species identification of microsporidial infections using SYBR Green real-time PCR. *J Med Microbiol* 60(4):459–466. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.026781-0>
- PostRJ, FlookPK, MillestAL (1993) Methods for the preservation of insects for DNA studies. *Biochem Syst Ecol* 21(1):85–92. [https://doi.org/10.1016/0305-1978\(93\)90012-G](https://doi.org/10.1016/0305-1978(93)90012-G)
- Quicke DL, Lopez-Vaamonde C, Belshaw R (1999) Preservation of hymenopteran specimens for subsequent molecular and morphological study. *ZOOL SCR* 28(1-2):261–267. <https://doi.org/10.1046/j.1463-6409.1999.00004.x>
- Ramos Hernández E, Leshner Gordillo JM, Oropeza Salín C, Ortiz García CF, Magaña Alejandro MA., et al. (2020). Detection and Identification of Phytoplasmas in the 16SrIV-A, -B, and -D Subgroups in Palms in Tabasco, Mexico. *Plant Dis* 104(10):2606–2612. <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-18-1488-RE>
- Rebrikov DV, Trofimov DY (2006) Real-time PCR: a review of approaches to data analysis. *Appl Biochem Microbiol* 42(5):455–463. <https://doi.org/10.1134/S0003683806050024>

- Reiss RA, Schwert DP, Ashworth AC (1995) Field preservation of Coleoptera for molecular genetic analyses. *Environ Entomol* 24(3):716–719. <https://doi.org/10.1093/ee/24.3.716>
- Rivero ER, Neves AC, Silva-Valenzuela MG, Sousa SO, Nunes FD (2006) Simple salting-out method for DNA extraction from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *Pathol Res Pract* 202(7):523–529. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2006.02.007>
- Schabel HG (2010) Forest insects as food: A global review. *Forest insects as food: Humans bite back*. 37 p.
- Siozios S, Massa A, Parr CL, Verspoor RL, Hurst GD (2020) DNA barcoding reveals incorrect labelling of insects sold as food in the UK. *PeerJ* 8:e8496.
- Silva BE, Zingoni ZM, Koekemoer LL, Dahan-Moss YL (2021) Microbiota identified from preserved Anopheles. *MALARIA J* 20(1):1–18. <https://doi.org/10.1186/s12936-021-03754-7>
- Simon C, Frati F, Beckenbach A, Crespi B, Liu H, et al. (1994) Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Ann Entomol Soc Am* 87(6), 651–701. <https://doi.org/10.1093/aesa/87.6.651>
- Sofronova JK, Ilinsky YY, Orishchenko KE, Chupakhin EG, Lunev, et al. (2016). Detection of mutations in mitochondrial DNA by droplet digital PCR. *Biochemistry (Moscow)* 81(10):1031-1037. <https://doi.org/10.1134/S0006297916100011>
- Thongjuek K, Chotigeat W, Bumrungsri S, Thanakiatkrai P, Kitpipit T (2019) A new cost-effective and fast direct PCR protocol for insects based on PBS buffer. *Mol Ecol Resour* 19(3):691–701. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13005>
- Tian EW, Yu H (2013) A simple and rapid DNA extraction protocol of small insects for PCR amplification. *Entomol News* 123(4):303–310. <https://doi.org/10.3157/021.123.0403>
- Trzebny A, Slodkiewicz-Kowalska A, Becnel JJ, Sanscrainte N, Dabert M (2020) A new method of metabarcoding Microsporidia and their hosts reveals high levels of microsporidian infections in mosquitoes (Culicidae). *Mol Ecol Resour* 20(6):1486–1504. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13205>
- Vítková M, Fuková I, Kubičková S, Marec F (2007) Molecular divergence of the W chromosomes in pyralid moths (Lepidoptera). *Chromosome Res* 15:917–930. <https://doi.org/10.1007/s10577-007-1173-7>
- Vrijenhoek R (1994) DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol Mar Biol Biotechnol* 3(5):294–299.
- Wald A, Wolfowitz J (1939) Confidence limits for continuous distribution functions. *Annals Math Stat* 10(2):105–118.
- Walter SD, Hildreth SW, Beaty BJ (1980) Estimation of infection rates in populations of organisms using pools of variable size. *Am J Epidemiol* 112(1):124–128. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a112961>
- Wang Q, Wang X (2012) Comparison of methods for DNA extraction from a single chironomid for PCR analysis. *Pak J Zool* 44(2).
- Weisser WW, Siemann E (2008) The various effects of insects on ecosystem functioning. In *Insects and ecosystem function* Springer, Berlin, Heidelberg. pp. 3–24. https://doi.org/10.1007/978-3-540-74004-9_1
- Williams J, Cowlshaw R, Sanou A, Ranson H, Grigoraki L (2021) In vivo functional validation of the V402L voltage gated sodium channel mutation in the malaria vector *An. gambiae*. *Pest Manag Sci* <https://doi.org/10.1002/ps.6731>
- Wilson EB (1927) Probable inference, the law of succession, and statistical inference. *J Am Stat Ass* 22(158):209–212.
- Wong WH, Tay YC, Puniamoorthy J, Balke M, Cranston PS, et al. (2014) ‘Direct PCR’ optimization yields a rapid, cost-effective, nondestructive and efficient method for obtaining DNA barcodes without DNA extraction. *Mol Ecol Resour* 14(6):1271–1280. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12275>
- Wu S, He YQ, Lu XM, Zhang XF, Shuai JB, et al. (2017) Early and simultaneous detection of *Nosema bombycis* (Microsporidia: Nosematidae), *nucleopolyhedrovirus* (Baculoviridae), and *densovirus* (Parvoviridae) by multiplex real-time polymerase chain reaction in *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae). *Can Entomol* 149(2):265–275. <https://doi.org/10.4039/tce.2016.54>
- Yang LH, Gratton C (2014) Insects as drivers of ecosystem processes. *Curr Opin Insect Sci* 2:26–32. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2014.06.004>
- Yudina MA, Bykov RA, Kotti BK, Vysochina NP, Stakheev VV, et al. (2019) *Wolbachia* Infection in Flea Populations (Insecta: Siphonaptera). *Biol Bull Rev* 9(5):403–411. <https://doi.org/10.7868/S0044459618030053>
- Yumoto K, Kanbe T, Saito Y, Kaneko S, Tsuda Y (2021) Efficient PCR amplification protocol of nuclear microsatellites for exuviae-derived DNA of cicada, *Yezoterpnosia nigricosta*. *Front Insect Sci* 1:7.
- Jalali SK, Ojha R, Venkatesan T (2015) DNA barcoding for identification of agriculturally important insects. In *New horizons in insect science: Towards sustainable pest management*. Springer, New Delhi. pp. 13–23. https://doi.org/10.1007/978-81-322-2089-3_2
- Jinbo U, Kato T, Ito M (2011) Current progress in DNA barcoding and future implications for entomology. *Entomological Science* 14(2):107–124. <https://doi.org/10.1111/j.1479-8298.2011.00449.x>
- Yoder M, De Ley IT, King IW, Mundo-Ocampo M, Mann J, et al. (2006) DESS: a versatile solution for preserving morphology and extractable DNA of nematodes. *Nematology* 8(3):367–376.
- Qiagen.com <https://www.qiagen.com/us/products/discovery-and-translational-research/sample-collection-stabilization/tissue-ffpe/allprotect-tissue-reagent/> (12.12.2021)

Translation of Russian References

- Bykov RA, Yurlova GV, Demenkova MA, Dubatolov VV, Kerchev IA et al. (2020) [High *Wolbachia* prevalence in populations of Siberian silk moth *Dendrolimus superans sibiricus* Tschetverikov, 1908 (Lepidoptera: Lasiocampidae) in the territory of Russia.]. *Zhurnal Obshchei Biologii* 81(5):387–393. (In Russian)
- Golub VB, Tsurikov MN, Prokin AA (2021) [Insect collections: collection, processing and storage of material].

- Moscow: Tovarishestvo nauchnykh izdaniy KMK. 385 c. (In Russian)
- Grzhibovskiy AM (2008) [Confidence intervals for frequencies and beats]. *Ekologiya cheloveka* 5:57–60. (In Russian)
- Kitaev KA, Udalov MB, Benkovskaya GV (2011) [Molecular genetic methods for the analysis of predation among insects in agrocenoses]. *Ekologicheskaya genetika* 9(4):15–24 (In Russian) <https://doi.org/10.17816/ecogen9415-24>
- Polyanichko AM (2007) [Agarose gel electrophoresis]. St. Petersburg: SPbGU. 43 p.
- Rebrikov DV, Samatov GA, Trofimov DY, Semenov PA, Savilova AM et al. (2009) [Real-time PCR]. Moscow: BINOM. Laboratoriya znaniya. 223 p. (In Russian)

Plant Protection News, 2021, 104(4), p. 184–195

OECD+WoS: 1.06+IY (Entomology)

<https://doi.org/10.31993/2308-6459-2021-104-4-15150>

Full-text review

INTRODUCTION TO MOLECULAR DIAGNOSTICS OF INSECTS

A.S. Ryabinin*, R.A. Bykov, V.K. Lapshina, A.A. Maslakova, M.A. Demenkova, Y.Y. Ilinsky

*corresponding author, e-mail: art@bionet.nsc.ru

Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia

Insects play an important role in biocenoses due to their abundance and wide (cosmopolitan) distribution. Many insects are crop pests. An effective pest control could be realized in case of proper species identification, which is usually managed by morphological analysis. Molecular methods allow to deep study of many issues of insect biology. In particular, traditional approach can not ordinary identify a species at all stages of their life cycle, whereas molecular methods can it. This review covers a wide range of issues related to the molecular genetic analysis of insects. In the first section we consider the methods of fixation and storage of insect specimens, as well as their impact on DNA quality. Further, we provide general information on population study design. Various schemes of DNA extraction, examples of both express techniques and more thorough protocols for DNA extraction and their purification are provided. In addition, methods of DNA isolation that allow to preserve a specimen integrity for further morphological studies are considered. The methods of DNA quality control are described in detail, that is important for PCR analysis. The last section provides various methods of PCR analysis, that we exemplify by studies aimed to elucidate both fundamental issues and practical problems.

Keywords: PCR, insects, sample, DNA, primers, sequencing

Submitted: 10.07.2021

Accepted: 15.12.2021