

*Китаев К.А., Удалов М.Б., Беньковская Г.В., Молекулярно-генетические
методы анализа хищничества среди насекомых в агроценозах //*

Экологическая генетика. Т. VIII. № 4. 2011.

Методы анализа хищничества у насекомых 1

УДК 57.081:574.43:595.7:632.7.08

**Молекулярно-генетические методы анализа
хищничества среди насекомых в агроценозах.**

© К.А. Китаев, М.Б. Удалов, Г.В. Беньковская

Учреждение РАН Институт биохимии и генетики УНЦ РАН,

450054 Уфа, просп. Октября, 71, Россия,

E-mail: cordek@ya.ru

АННОТАЦИЯ

Проблема определения количественных отношений хищников и жертв среди насекомых в агроценозах стала актуальной при разработке методов биорационального контроля. Многие виды насекомых не могут исследоваться традиционными методами из-за особенностей их поведения и жизненной формы, поэтому рекомендуется использовать методы анализа содержимого кишечника хищников. Приводится сравнение двух методов анализа (полимеразная цепная реакция (ПЦР) и серологического анализа). Описано планирование эксперимента при ПЦР-анализе и рассмотрены дополнительные возможности ПЦР-анализа.

Ключевые слова: отношения хищник-жертва, анализ содержимого кишечника, ПЦР, молекулярная экология, биологический контроль

ВВЕДЕНИЕ

Трофические отношения, наряду с конкуренцией и мутуализмом, являются наиболее общими и значимыми в экосистемах. Одной из важнейших фундаментальных проблем синэкологии является выявление закономерностей формирования и

поддержания трофических взаимодействий энтомокомплексах биоценозов. Особенности класса насекомых, обеспечивающие быстрое расселение, размножение и адаптацию к новым условиям среды, определяют возможность возникновения множества трофических взаимодействий как внутри энтомокомплекса, так и с другими группами организмов.

При создании искусственных экосистем, в первую очередь в сельском хозяйстве, проблема образования трофических связей среди насекомых приобретает большое практическое значение. Исследование энтомофауны агроценозов необходимо для формирования методов и выбора средств защиты растений. Современные средства защиты растений, основанные на применении инсектицидов, быстро теряют эффективность из-за появления у насекомых-вредителей резистентности к применяемым препаратам (Беньковская и др., 2008а). Давно назрела необходимость перехода к более эффективным и долгодействующим, но в то же время менее опасным для окружающей среды методам контроля численности вредителя. Современное сельское хозяйство нуждается в таких технологиях, но их внедрение затрудняется отсутствием фундаментальных данных об экологии агроценозов. «В первую очередь это относится к формированию устойчивых трофических связей в искусственных агроценозах» (Чернышев, 2001).

Необходимо оценить количественные отношения в трофических сетях, знание о которых позволит разработать модели изменения численности жертв и хищника в агроценозах, позволяющие аргументировано принять новые оптимизированные методы контроля (Коваль, 2005, Мохрин, 2009, Babendreier *et al.*, 2010, Sugonyaev, 2009а, 2009b). Хорошо известны трофические связи между тлями и многими хищниками, но агроценозы претерпевают изменения и трофические отношения меняются. Появляются

Методы анализа хищничества у насекомых 3

новые хищники, роль которых не ясна, и требуются новые исследования (Harwood, Obruski, 2005). Точные количественные отношения нельзя определить, пользуясь только лабораторными методами. Необходимо объединять полевые и лабораторные исследования для получения точных данных (Hagler *et al.*, 2004).

Мы постарались собрать и рассмотреть методы, позволяющие изучить трофические взаимодействия между энтомофагами и насекомыми-фитофагами, являющимися сельскохозяйственными вредителями. Особенно это актуально при исследовании инвазивных видов, для которых процесс включения в трофические сети находится на начальном этапе (Greenstone *et al.*, 2007, 2010; Jansen, Hautier, 2008; Roy, Wajnberg, 2008; Harwood *et al.*, 2009; Szhendrey *et al.*, 2010). Молекулярные методы анализа могут применяться тогда, когда другие методы неэффективны, например, при исследовании почвенных, подстилочных и ночных хищников (Juen, Trougott, 2005; King *et al.*, 2010), в этом случае невозможно прямое наблюдение в естественных условиях, а содержание в искусственной среде и косвенная оценка количественных отношений хищников и жертв недостаточно информативна и может не учитывать естественную доступность объектов питания для хищника. Развитие многих насекомых-вредителей связано с почвой (например, *Leptinotarsa decemlineata* Say, *Melolontha melolontha* L., *Diabrotica virgifera* LeConte) и исследование влияния почвенной биоты на регуляцию численности этих насекомых становится насущной необходимостью.

ОБЗОР МЕТОДОВ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ХИЩНИЧЕСТВА

Определение хищничества проводится с привлечением методов визуального наблюдения, содержания в искусственных условиях и анализа содержимого кишечника.

В полевых условиях основным методом является непосредственное визуальное наблюдение за скоплениями фитофагов и определение хищников, атакующих их. Этот метод весьма достоверен, поскольку дает представление об естественных отношениях хищников и жертв. Если случаи хищничества повторяются периодически можно определить количественное отношение хищников и жертв. Но подобные методы не годятся для исследований почвенных и подстилочных хищников, поскольку их сложно наблюдать непосредственно в среде обитания. Многие из этих видов активно хищничают по ночам, что еще больше затрудняет наблюдение. В таком случае необходимо собрать живых хищников и проводить исследования в искусственных условиях (Hagler *et al.*, 2004; Harwood, Obrycki, 2005).

Лабораторное содержание дает возможность оценить пищевую активность хищников, а также избирательность их питания. Это позволяет получить данные, которые можно экстраполировать на естественные биотопы и агроценозы, учитывая существенные отличия искусственных и естественных систем. В первую очередь это определение наиболее предпочитаемых жертв и оценка суточного рациона. Знание о численности хищников и их возможном суточном потреблении целевых жертв не позволяет судить об их пищевой активности в агроценозах, поскольку необходимо учитывать доступность тех или иных видов фитофагов для энтомофагов в естественных условиях (Tshernyshev *et al.*, 2010). Многие хищники-полифаги, например жуки семейства жужелиц, могут питаться различными насекомыми, не отдавая им предпочтения в естественных условиях, поскольку предполагаемые жертвы (например, личинки колорадского жука) обладают эффективными средствами защиты (Коваль, 2009).

Следовательно, наиболее предпочтительными выглядят методы исследования

Методы анализа хищничества у насекомых 5

содержимого кишечника хищников, пойманных в естественных условиях. Подобные работы приобретают все большую популярность, особенно при исследовании представителей отряда жесткокрылых, отличающихся крупными размерами (рис. 1).

Содержимое кишечника можно исследовать несколькими методами:

1. Визуальное исследование и определение жертв по их остаткам (Harwood, Obrycki, 2005).
2. Серологический анализ с использованием антител к видоспецифичным белкам жертвы (Соболева-Докучаева, Подоплелов, 1972; Harwood, Obrycki, 2005).
3. Использование радиоактивных меток или масс-спектрометрии стабильных изотопов (Harwood, Obrycki, 2005).
4. Электрофорез для дифференциации спектра изоферментов жертвы и хищника (Harwood, Obrycki, 2005).
5. Выявление ДНК жертвы методом ПЦР с видоспецифичными праймерами (Harwood, Obrycki, 2005; Zaidi *et al.*, 1999).

Наиболее точными и простыми методами анализа являются молекулярные методы: серологический анализ с помощью антител и ПЦР-анализ с помощью видоспецифичных праймеров. Эти методы позволяют с большой точностью определить факт хищничества по небольшим остаткам жертвы в кишечнике хищника (Greenstone *et al.*, 2007; Kuusk, 2009; Weber, Lundgren, 2009; Zaidi *et al.*, 1999).

СРАВНЕНИЕ ПЦР И СЕРОЛОГИЧЕСКОГО АНАЛИЗА

Основное сравнение проводится по трем характеристикам: скорость проведения анализа, точность определения хищничества, стоимость анализа одного исследуемого образца.

Серологический анализ проводится быстрее чем ПЦР, но он более трудоемок и

дорог при разработке, на этапе получения необходимых антител. Но для анализа небольшого количества образцов метод ПЦР более удобен, поскольку не требует долгого этапа подготовки (Zaidi *et al.*, 1999). Чрезвычайно важной проблемой при этом становится выбор видоспецифичных белков жертв, отличающихся от белков хищника. Ниже будет рассмотрено, как решается подобная проблема при выборе видоспецифичных праймеров для проведения ПЦР-анализа.

Точность серологического метода пока обсуждается, и предлагаются новые подходы, основанные, в частности, на предварительной обработке жертв хищника синтезированным белком, не встречающимся у жертв и хищников. При обработке яиц и последующем анализе содержимого кишечника хищников, питавшихся этими яйцами, двумя разными наборами антител (к природному белку и к искусственному), выяснилось, что традиционный способ на 30-40% менее точный. Время переваривания естественного белка оказывается коротким (порядка 4 часов), искусственный белок переваривается дольше (более 24 часов) (Mansfield *et al.*, 2008).

Точность ПЦР-анализа зависит от вида жертв и хищников, а также от выбранных пар праймеров, но результаты исследований показывают возможность точного определения хищничества в течении 16 – 24 часов после питания хищника целевой жертвой (Greenstone *et al.*, 2007; Weber, Lundgren, 2009). Непосредственное сравнение двух методов не позволило обнаружить существенной разницы в точности (Fournier *et al.*, 2008), и тот и другой метод выявляют примерно одинаковое количество хищников, точность методов варьируется в зависимости от таксономической принадлежности насекомых (у клопов и пауков скорость переваривания оказывается ниже и анализ получается точнее) (Greenstone *et al.*, 2007; Fournier *et al.*, 2008; Mansfield *et al.*, 2008).

ПЦР обходится дороже, чем серологический анализ в пересчете на один

Методы анализа хищничества у насекомых 7

исследованный образец, отличаясь в некоторых случаях (при массовом исследовании) по стоимости на порядок. При исследовании хищников цикады *Homalodisca vitripenni* ПЦР-анализ обходился в 7,5 долларов США на образец (стоимость праймеров не приводится), серологический анализ стоил по 0,5 долларов США за образец, но на разработку антител потребовалось 12000 долларов США и год времени (Fournier *et al.*, 2008). Там же приводится ссылка на исследователей, по-другому оценивающих ПЦР и серологический анализ (0,28 и 0,21 долларов соответственно) (Chen *et al.*, 2000). ПЦР имеет плохую масштабируемость, поскольку основные затраты, зависящие от количества образцов, составляют реактивы, праймеры, работа исследователей и оборудования. Поэтому ПЦР-анализ выгоден в небольших исследованиях, когда планируется использовать до 1500 образцов. Если планируется анализировать большее количество образцов (5000 – 30000), то выгоднее использовать серологический анализ. Объем выборки, равный 1000 образцов, вполне достаточен для получения достоверных данных, подтверждающих хищничество в отношении одного вредителя. У естественных энтомофагов колорадского жука положительный результат анализа дают 30-80% особей. У видов ранее не проявлявшие предпочтения к питанию яйцами и личинками колорадского жука положительный результат дают до 10-15% особей (Greenstone *et al.*, 2010, Szendrei *et al.*, 2010).

ПЛАНИРОВАНИЕ ЭКСПЕРИМЕНТА

Экспериментальное определение хищничества с помощью ПЦР-анализа содержимого кишечника включает как полевые так и лабораторные исследования и состоит из нескольких этапов:

1. Дизайн праймеров и проверка их на видоспецифичность.
2. Сбор живых хищников и предполагаемых жертв для содержания в

лаборатории.

3. Отработка метода, которая заключается в кормлении хищников в лаборатории и фиксация их через увеличивающиеся промежутки времени.

4. Полевое исследование. В зависимости от вида хищников могут использоваться разные методы сбора. Обязательным является использование фиксирующей жидкости, останавливающей деградацию ДНК в кишечнике.

5. Выделение ДНК и проведение ПЦР. Определение среднего времени детекции ДНК жертвы в кишечнике хищников.

6. Сопоставление лабораторных и полевых данных для получения количественных отношений хищников и жертв.

ПОДБОР ВИДОСПЕЦИФИЧНЫХ ПРАЙМЕРОВ

Видоспецифичные праймеры можно подобрать к различным последовательностям ДНК целевых жертв хищников. Такие последовательности можно получить, например, при секвенировании РАПД фрагментов (Zhang *et al.*, 2007). РАПД-анализ (RAPD – Random Amplified Polymorphic DNA) позволяет разделять виды, выявляя случайные видоспецифичные последовательности. В нём используется только один короткий праймер, при амплификации с которым ДНК разных организмов дает несколько ПЦР-фрагментов разной длины. Количество копий таких фрагментов в геномной ДНК довольно велико и метод можно использовать с любыми видами насекомых (Удалов и др., 2003, 2009). Однако, секвенирование таких последовательностей затруднено их неоднородностью и наличием множества повторов.

Для тех задач, которые ставятся в наших исследованиях, лучше использовать последовательности митохондриальной ДНК (мтДНК).

Методы анализа хищничества у насекомых 9

Выбор митохондриальной ДНК объясняется несколькими причинами:

1) Количество копий митохондриальных генов может превышать количество копий генов ядерного генома в несколько десятков раз. В выделенной тотальной ДНК количество их гораздо больше, следовательно, обнаружить такие последовательности легче.

2) Деградация мтДНК происходит медленнее чем ядерной, из-за меньшей вероятности появления разрывов и нарушений последовательности, поскольку мтДНК имеет небольшой размер и кольцевое строение (King *et al.*, 2008).

3) Некоторые митохондриальные гены очень консервативны и существуют праймеры для их амплификации, подходящие для последовательностей мтДНК многих насекомых. Такие последовательности чаще исследуются и для многих насекомых определены последовательности митохондриальных генов (Simon *et al.*, 1994).

4) В мтДНК консервативные последовательности чередуются с переменными. Это свойство мтДНК послужило основой для развития баркодинга – метода определения видов по ДНК (Greenstone *et al.*, 2005; Lukhtanov *et al.*, 2009). Это позволяет получать видоспецифичные праймеры, по последовательностям, секвенированным с помощью универсальных праймеров.

На практике преимущество выбора последовательностей мтДНК перед ядерной было достаточно убедительно доказано непосредственным сравнением нескольких пар праймеров для последовательностей примерно одинаковой длины (сравнивались гены *coxI* и *esterase*) (King *et al.*, 2008; Schmidt *et al.*, 2009).

Последовательности митохондриальных генов интересующих видов секвенируют с использованием универсальных праймеров митохондриальных генов (Simon *et al.*, 1994). Это позволяет получить последовательности мтДНК для подбора

видоспецифичных праймеров с использованием компьютерных программ, например, Primer3 (Rozen, Skaletsky, 2000) и базы нуклеотидных последовательностей National center for biotechnology information (NCBI). Поскольку программа работает на сервере NCBI (или других), она может обрабатывать всю базу известных нуклеотидных последовательностей. При этом исключаются все возможные невидоспецифичные праймеры. Пары праймеров подбираются автоматически для уникальных последовательностей, которые располагаются в определенных участках митохондриального генома.

К сожалению, мы ограничены размерами данной статьи, и не можем более подробно остановиться на перечне праймеров (с их характеристиками), и перечне видов насекомых-энтомофагов, используемых в подобных исследованиях. Заинтересованному читателю мы можем порекомендовать следующие работы (Greenstone *et al.*, 2005, 2007; Harper *et al.*, 2005; Hosseini *et al.*, 2008; Juen, Traugott, 2005). Принципы разработки праймеров обсуждаются в книге "Искусственные генетические системы" (Патрушев, 2004).

Поскольку часть ДНК может быть повреждена в кишечнике или при выделении длина амплифицируемого фрагмента должна быть 200-300 п.н. (Juen, Trougott, 2005; King *et al.*, 2008; Schmidt *et al.*, 2009).

Для проверки на видоспецифичность необходимо выделить ДНК из хищников и их предполагаемых жертв и провести ПЦР с этими образцами. Выделение следует проводить из мышц лапок или жирового тела насекомого для того, чтобы избежать загрязнения чужеродной ДНК.

СБОР МАТЕРИАЛА

Энтомофагов собирают в естественных биоценозах и агроценозах, при этом

необходима быстрая фиксация хищников для остановки деградации ДНК жертвы в кишечнике энтомофага. Существуют несколько способов фиксации, дающих разные результаты (табл. 1). Наиболее эффективными являются замораживание в сжиженном азоте до температуры -80°C и фиксация сильно охлажденным этанолом. Но эти методы фиксации являются весьма трудоемкими и затратными, требуют специального оборудования или морозильных камер, которые малодоступны в полевых условиях. Вполне приемлемые результаты дает фиксация в этаноле или $\sim 45\%$ водном растворе этиленгликоля (анализировался антифриз, изготовленный по стандарту BS 6580: 1992 Великобритания, ему соответствует тосол – по ГОСТ 28084-89 Россия) при комнатной температуре (Weber, Lundgren, 2009). Подобные фиксаторы легко использовать в полевых условиях. Они сразу убивают животное и, пропитывая его ткани, останавливают деградацию ДНК жертвы в кишечнике. Эти жидкости можно оставлять на долгое время (до недели) в круглосуточных ловушках, в том числе и почвенных. Такие фиксаторы позволяют сохранять образцы в течение достаточно длительного времени до анализа содержимого кишечника.

ВЫДЕЛЕНИЕ ДНК

Содержимое брюшка фиксированного хищника гомогенизируют в фосфатном буфере (150 мМ хлорид натрия, 150 мМ фосфат натрия, pH 7,2). Полученный гомогенат используется для выделения ДНК (Juen, Trougott, 2005, Zaidi *et al.*, 1999). Данный подход может применяться при анализе любых хищных насекомых (Greenstone, Shufran, 2003; Greenstone *et al.*, 2005, Weber, Lundgren, 2009). Следует извлекать внутренние органы и ткани и гомогенизировать насекомое без попадания хитиновых фрагментов покровов, поскольку хитин может связывать ДНК и препятствовать её растворению.

Также возможно исследование содержимого кишечника после извлечения его из вскрытого хищника или с применением анализа собранных экскрементов (Harwood, Obruski, 2005). Вскрытие кишечника или сбор экскрементов насекомого является трудоемкой задачей для исследователя и существенно замедляет процесс определения хищничества, хотя этот этап может быть необходимым при некоторых исследованиях.

Выделение ДНК при исследовании содержимого кишечника осуществляется по стандартизированным методикам (Greenstone *et al.*, 2007; Juen, Trougott, 2005; Weber, Lundgren, 2009). Достаточно оптимальным считается использование метода фенол-хлороформной экстракции с использованием лизирующего буфера на основе гуанидина тиоцианата (4 М гуанидин тиоцианат, 25 мМ цитрат натрия, 0,5% лаурилсаркозинат натрия (саркозил), 0,1 М β-меркаптоэтанол). Данный лизирующий буфер успешно применяется для выделения тотальной ДНК, клеточной мРНК, вирусных ДНК и РНК (Баринов и др., 2005; Беньковская и др., 2008б; Данилевич, Гришин, 2002; Удалов и др., 2010; Benkovskaya *et al.*, 2008; Chomczynski, Sacchi, 1987). Используются и другие лизирующие буферы, например, на основе додецилсульфата натрия с протеиназой К (Aljanabi, Martinez, 1997). Лизирующий буфер разрушает клеточные мембраны и белки, связанные с ДНК. После лизирования раствор смешивают с фенол-хлороформом для очищения его от белков. Для очистки раствора от производных хитина и других углеводных примесей, которые могут ингибировать ПЦР, используется ацетат аммония в концентрации 3-5 М (Juen, Trougott, 2005; Zaidi *et al.*, 1999). После высаливания углеводных полимеров ДНК из раствора осаждают и промывают ~70% этанолом. Затем осадок растворяют в стерильной воде (Aljanabi, Martinez, 1997; Chomczynski, Sacchi, 1987). Могут использоваться готовые наборы для выделения, что существенно упрощает задачу исследователя (Kuusk, 2009), например, набор для выделения

нуклеиновых кислот фирмы Qiagen – QIAamp DNA Stool Mini Kit (Schmidt *et al.*, 2009). Качество выделения проверяется электрофорезом в агарозном геле для определения степени сохранности молекул (Aljanabi, Martinez, 1997). Спектрофотометрическим способом можно определить степень чистоты по отношению оптической плотности, измеренной при длине волны 260 нм и 280 нм. Если отношение менее 1,8, то образец загрязнен белками или фенолом (Маниатис и др., 1984). Для насекомых подобраны несколько универсальных праймеров к митохондриальной ДНК (Simon *et al.*, 1994), которые позволяют определить наличие в образцах ингибиторов реакции.

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР

Современные амплификаторы работают в автоматическом режиме с использованием заданной программы. Программу для ПЦР составляют с учетом особенностей праймеров (температуры отжига) и используемой ДНК-полимеразы (разные полимеразы имеют различные температуры оптимума реакции). Количество циклов выбирают от 30 до 40 (Fournier *et al.*, 2005; Juen, Trougott, 2005; Greenstone *et al.*, 2007). Возможно увеличение числа циклов до 45-50 (Schmidt *et al.*, 2009; Weber, Lundgren, 2009). Но практика проведения количественной ПЦР показывает, что 40 циклов достаточно для того, чтобы в растворе концентрация нуклеозидтрифосфатов и праймеров упала ниже реакционного минимума. Даже при отсутствии целевой последовательности ДНК происходит амплификация за счет неспецифического отжига и димеризации праймеров. Поскольку видоспецифичные праймеры имеют длину 25 – 28 нуклеотидов, то при амплификации образуется множество неспецифичных продуктов реакции, что затрудняет анализ, поэтому требуется оптимизация условий ПЦР для каждого нового вида насекомого или для нового набора праймеров.

Визуализацию результатов проводят с использованием электрофореза в агарозном

или полиакриламидном геле (рис. 2). Выбор геля определяется потребностями в точности разделения амплифицированных фрагментов и их длины.

ОПТИМИЗАЦИЯ ПЦР

Качество анализа зависит от условий, в которых происходит реакция. Основные параметры реакционной смеси (рН, концентрация ионов, количество полимеразы и нуклеозидтрифосфатов) зависят от используемых наборов реактивов и в большинстве случаев изменение их не требуется. При оптимизации меняют время, затрачиваемое на 1 цикл, и температуру отжига праймеров. Для отжига необходимо инкубировать смесь (объем 30 мкл) в течении 40-60 секунд. Меньший объем (10 мкл) требует меньшего времени, до 20 секунд. Первые 5 циклов можно удлинить в два раза, для увеличения выхода продукта на начальных этапах ПЦР.

Температура отжига праймеров зависит от их длины и нуклеотидного состава. Некоторые исследователи рекомендуют снижать температуру отжига ниже расчетной, для получения более качественного результата (Sint *et al.*, 2011).

При проведении ПЦР часто возникает проблема кроссконтаминации образцов. Для выявления контаминации обязательно добавление нулевого контроля – реакционной смеси без образца ДНК. При постановке реакции в реакционную смесь может попасть молекула ДНК из воздуха с пылью или с рук исследователя. Для предотвращения контаминации необходимо разные этапы анализа (ПЦР, электрофорез) проводить в разных помещениях. Помещения должны подвергаться ежедневному кварцеванию и влажной уборке рабочих поверхностей (Ребриков и др., 2009).

КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ

Для уточнения оценки количественных отношений хищников и жертв необходимо определить скорость деградации ДНК в кишечнике и среднее время детекции

Методы анализа хищничества у насекомых 15

хищничества (или время полураспада), то есть тот период, за который количество достоверно определяемых случаев хищничества уменьшается вдвое. В ряде работ показана специфика этого показателя в зависимости от видов хищников и жертв (Juen, Trougott, 2005; Greenstone *et al.*, 2007; Sheppard *et al.*, 2005). Для его определения хищников содержат в лаборатории и после кормления целевыми жертвами фиксируют для выделения ДНК через увеличивающиеся промежутки времени. Достаточно 4-х групп хищников по 10 особей, умерщвляемых через 8, 16, 24 и 32 часа после кормления. По данным анализа содержимого кишечника этих особей строится регрессионная кривая и определяется среднее время детекции хищничества.

Необходимо при этом также учитывать влияние различных абиотических факторов (температура, влажность и др.) на скорость переваривания пищи в кишечнике хищников и, соответственно, на качество определения случаев хищничества (Berg *et al.*, 2008a, 2008b; Hosseini *et al.*, 2008).

После лабораторной оценки времени деградации ДНК жертвы в кишечнике хищника возможна экстраполяция результатов анализа полевых образцов, собранных в короткие периоды времени, позволяющая определить количество хищников, питавшихся целевыми жертвами. На основе этого показателя, а также сведениях о численности хищников, можно рассчитать их влияние на популяции жертв.

В дальнейшем, проводя различные эксперименты в полевых условиях, можно использовать эти данные для определения активности и эффективности хищников в разных условиях. Сознательное изменение условий выращивания растений для привлечения хищников и применение молекулярно-генетического анализа позволят создать интегрированные технологии, использующие биологическую регуляцию численности вредителя (Greenston *et al.*, 2010; Szendrey *et al.*, 2010).

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ

С помощью количественной ПЦР (quantitative PCR), в частности ПЦР в реальном времени (real time PCR), можно определить количество ДНК жертвы в кишечнике и установить точное время полного её разрушения, также этим методом была установлена эффективность различных фиксаторов (Weber, Lundgren, 2009). Кроме того, ПЦР в реальном времени позволяет определить эффективность детекции при использовании праймеров к разным участкам последовательности ДНК и выявить наиболее эффективные пары праймеров (Schmidt *et al.*, 2009).

Мультиплексная ПЦР проводится сразу с несколькими парами праймеров, специфичными для последовательностей ДНК разных видов или генов и позволяет определить спектр жертв для исследуемого хищника (Greenstone *et al.*, 2005; Harper *et al.*, 2005; King *et al.*, 2008, 2010; Traugott, Symondson, 2008), что чрезвычайно важно при исследовании всех возможных трофических взаимодействий, поскольку многие хищники потребляют в пищу представителей разных видов. Определение этого спектра позволяет выявить закономерности в пространственном распределении, суточной и сезонной активности хищника в отношении вредителя, а также найти возможности для усиления или снижения этой активности (Symondson *et al.*, 2006). Проведение мультиплексной ПЦР сопряжено с некоторыми методическими трудностями, поэтому метод пока не распространен в экологических исследованиях.

Показана возможность использования универсальных праймеров с последующим разделением продуктов амплификации термоградиентным электрофорезом (Harper *et al.*, 2006).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Определение трофических связей в агроэкосистемах необходимо для развития и

Методы анализа хищничества у насекомых 17

применения интегрированных методов контроля численности вредителей. Распространение молекулярно-генетических методов анализа в сельскохозяйственной практике (Сиволап и др., 1998; Удалов и др., 2003) позволяет использовать их и для решения этой проблемы. Если имеются уже определенные последовательности мтДНК, подбор праймеров и последующий анализ существенно упрощаются. Приведенные методики можно использовать при наличии минимально оборудованной лаборатории и в настоящее время возможно проведение экспресс-анализа в небольших мобильных лабораториях. Поскольку для достаточно точного определения ДНК жертвы в нескольких особях необходимо исследовать много образцов, следует акцентировать внимание на наиболее распространенных хищниках. В этом случае количество образцов будет не более 800-1000, и использование ПЦР-анализа представляется вполне оправданным с экономической точки зрения. Но только молекулярных методов анализа недостаточно, необходимо также исследование поведенческой активности, поскольку оценка количества ДНК не дает точных данных о количестве потребленных хищником особей жертвы. Совмещение двух методов исследования (ПЦР-анализ и содержание хищников в лабораторных условиях) позволяет получить точные количественные данные по пищевой активности хищника и доступности тех или иных жертв для него в природных условиях.

Важным остается вопрос о возможности вторичного хищничества, которое также дает положительный результат при серологическом и ПЦР-анализе (Harwood *et al.*, 2001; Sheppard *et al.*, 2005). Влияние вторичного хищничества на количественные данные, полученные при анализе содержимого кишечника, можно определить путем анализа поведенческой активности в лабораторных условиях. По избирательности пищевой активности крупных хищников в отношении интересующих исследователя

насекомых-вредителей и мелких хищников составляет отношение случаев возможного вторичного хищничества к первичному. В полевых условиях можно определить доступность вредителей для разных хищников по относительной численности, определяемой разными методами, используемыми при массовом сборе. По этим данным примерно оценивается доля вторичного хищничества. Это соотношение можно использовать для расчета влияния разных хищников на численность насекомых-жертв при построении моделей биологической регуляции численности вредителей.

В дальнейшем возможно применение этих методов для дополнительных исследований энтомофагов. Развитие и оптимизация подготовительных этапов анализа могут способствовать всестороннему изучению хищнической активности в лабораторных и полевых условиях и построению эффективных технологий защиты растений с использованием естественных факторов регуляции численности насекомых-вредителей.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность с.н.с., к.б.н. Никонорову Ю.М. (Институт биохимии и генетики УНЦ РАН, г. Уфа) за помощь и консультации в области использования молекулярно-генетических методов. Работа была выполнена в рамках проектов, поддержанных Российским фондом фундаментальных исследований (гранты № 09-04-00391-а, 11-04-01886-а и 11-04-97022-р_поволжье_а). Авторы благодарят рецензентов за подробный критический разбор рукописи, за конструктивные и ценные замечания.

Методы анализа хищничества у насекомых 19

**Molecular-genetic methods of the investigation
of trophic relationships in the agrocoenosis.**

K.A. Kitaev, M.B. Udalov, G.V. Benkovskaya.

Establishment of RAS Institute of biochemistry and genetics

E-mail: cordek@ya.ru

Summary

The problem of determine quantitative predation rate is actuality for development methods of biocontrol. Many species of insect could not be investigated by traditional methods through features of its behavior and life-form, and we have must analyzed gut content of predators. Efficacy and cost of two methods analyzes (PCR and antibodies) are compared. Project of experiment with PCR-analyze is described and additional possibility of PCR-analyze is shown.

Key-words: Predator–prey interactions, Gut content analysis, polymerase chain reaction (PCR), molecular ecology, biological control.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Баринов М.К., Удалов М.Б., Тулаева И.А., Поскряков А.В., 2005. Использование метода RAPD-PCR для выявления резистентных к демитану и талстару генотипов обыкновенного паутинного клеща *Tetranychus urticae* Koch (Acarina, Tetranychidae) // Агрехимия. № 5. С. 1 – 6.

Беньковская Г.В., Леонтьева Т.Л., Удалов М.Б., 2008а. Резистентность колорадского жука на Южном Урале // Агрехимия. № 8. С. 1 – 5.

Беньковская Г.В., Удалов М.Б., Хуснутдинова Э.К., 2008б. Генетическая основа и фенотипические проявления резистентности колорадского жука к фосфорорганическим инсектицидам // Генетика. Т. 44. № 5. С. 638 – 644.

Данилевич В.Н., Гришин Е.В., 2002. Новый подход для выделения геномной ДНК из дрожжей и грибов: получение ДНК-содержащих клеточных оболочек и их прямое использование в ПЦР // Биоорганическая химия. Т. 28. № 2. С. 156 – 167.

Коваль А.Г., 2005. Жужелицы (Coleoptera, Carabidae) полей овощных паслёновых культур (видовой состав, экология, биология, энтомофаги колорадского жука): Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Санкт-Петербург, 33 с.

Коваль А.Г., 2009. Жужелицы (Coleoptera, Carabidae) агроценоза картофеля европейской части России и сопредельных территорий // Чтения памяти Холодковского. Санкт-Петербург. Вып 61 (2), 98 с.

Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж., 1984. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование: Пер. с англ. Москва. Мир, 480 с.

Мохрин А.А., 2009. Видовой состав и эколого-биоценотические связи кокцинелл (Coleoptera, Coccinellidae) в агробиоценозах Ставропольской возвышенности: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Санкт-Петербург, Пушкин, 22с.

Патрушев Л.И., 2004. Искусственные генетические системы. Том 1 Генная и белковая инженерия. Москва: Наука, 526 с.

Ребриков Д.В., Саматов Г.А., Трофимов Д.Ю. и др., 2009. ПЦР в реальном времени. Москва: БИНОМ. Лаборатория знаний, 223 с.

Сиволап Ю.М., Календарь Р.Н., Вербицкая Т.Г. и др., 1998. Использование ПЦР-анализа в генетико-селекционных исследованиях / под ред. Ю.М. Сиволапа. Киев: Аграрна наука, 156 с.

Соболева-Докучаева И.И., Подоплелов И.И., 1972. Изучение специфических антисывороток к растворимым белкам некоторых кормовых объектов жуужелиц (Carabidae) // Зоол. журнал. Т. 51. вып. 2. С. 280 – 286.

Удалов М.Б., Беньковская, Г.В., Поскряков А.В., Николенко А.Г., 2009. Полиморфизм ДНК в изучении популяций членистоногих // Успехи современной биологии. Т. 129. №. 1. С. 51 – 57.

Удалов М.Б., Козьминов С.Г., Беньковская Г.В., 2010. Проблемы интродукции и внутривидовой гибридизации *Apis mellifera* // Известия Самарского Научного Центра РАН. Т. 12. № 1(3). С. 835 – 837.

Удалов М.Б., Поскряков А.В., Беньковская Г.В., Николенко А.Г., 2003. Молекулярно-биологические методы мониторинга резистентности к инсектоакарицидам в популяциях членистоногих // Агрехимия. № 6. С. 81 – 88.

Чернышев В.Б., 2001. Экологическая защита растений. Членистоногие в агроэкосистеме. Москва, 136 с.

Aljanabi S.M. Martinez I., 1997. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques // Nucleic acid research. Vol. 25. № 22, P. 4692 – 4693.

Babendreier D., Jenner W., Hunt E., Grossrieder M., 2010. Framework for the sustainable use of pesticides across the EU Member States: challenges and opportunities for implementing IPM // IX European congress of Entomology programme and book of abstracts. Budapest, P. 195.

Benkovskaya G.V., Udalov M.B., Khusnutdinova E.K. 2008. The Genetic Base and Phenotypic Manifestations of Colorado Potato Beetle Resistance to Organophosphorus Insecticides // Russian Journal of Genetics. Vol. 44. N. 5. P.553 – 558.

Berg K., Traugott M., Symondson W.O.C., Scheu S., 2008a. Impact of abiotic factors on predator-prey interactions: DNA-based gut content analysis in a microcosm experiment // Bulletin of Entomological Research. Vol. 98. N. 3. P. 257 – 261.

Berg K., Traugott M., Symondson W.O.C., Scheu S., 2008b. The effects of temperature on detection of prey DNA in two species of carabid beetle // Bulletin of Entomological Research. Vol. 98. P. 263 – 269.

Chen Y, Giles K.L., Payton M.E., Greenstone M.H., 2000. Identifying key cereal aphid predators by molecular gut analysis // Molecular Ecology. Vol. 9. P. 1887 – 1898.

Chomczynski P, Sacchi N., 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction // Analytical Biochemistry. Vol. 162(1). P. 156 – 159.

Fournier V., Hagler J., Daane K. *et al.*, 2008. Identifying the predator complex of *Homalodisca vitripennis* (Hemiptera: Cicadellidae): a comparative study of the efficacy of an ELISA and PCR gut content assay // Oecologia. Vol. 157. P. 629 – 640.

Greenstone M.H., Shufran K.A., 2003. Spider predation: species-specific identification of gut contents by polymerase chain reaction // The journal of arachnology. Vol. 31. P. 131 – 134.

Greenstone M.H., Rowley D.L., Heimbach U., 2005. Barcoding generalist predators by polymerase chain reaction: carabids and spiders // *Molecular Ecology*. Vol. 14. P. 3247 – 3266.

Greenstone M.H., Rowley D.L., Weber D.C. *et al.*, 2007. Feeding mode and prey detectability half-lives in molecular gut-content analysis: an example with two predators of the Colorado potato beetle // *Bulletin of Entomological Research*. Vol. 97. P. 201 – 209.

Greenstone M.H., Szendrei Z., Payton M.E. *et al.*, 2010. Choosing natural enemies for conservation biological control: use of the prey detectability half-life to rank key predators of Colorado potato beetle // *Entomologia Experimentalis et Applicata*. Vol. 136. P. 97 – 107.

Hagler J.R., Jackson C.G., Isaacs R., Machtley S.A., 2004. Foraging behavior and prey interactions by a guild of predators on various lifestages of *Bemisia tabaci* // *J. of Insect Science*. Vol. 4. N. 1. 13 pp. available online: insectscience.org/4.1

Harper G.L., King R.A., Dodd C.S. *et al.*, 2005. Rapid screening of invertebrate predators for multiple prey DNA targets // *Molecular Ecology*. Vol. 14. P. 819 – 827.

Harper G.L., Sheppard S.K., Harwood J.D. *et al.*, 2006. Evaluation of temperature gradient gel electrophoresis for the analysis of prey DNA within the guts of invertebrate predators // *Bull Entomol. Res.* Vol. 96(3). P. 295 – 304.

Harwood J.D., Obrycki J.J., 2005. Quantifying aphid predation rates of generalist predators in the field // *Eur. J. Entomol.* Vol. 102. P. 335 – 350.

Harwood J.D., Phillips S.W., Sunderland K.D., Symondson W.O.C., 2001. Secondary predation: quantification of food chain errors in an aphid-spider-carabid system using monoclonal antibodies // *Molecular Ecology*. Vol. 10, P. 2049 – 2057.

Harwood J.D., Yoo H.J.S., Greenstone M. H. *et al.*, 2009. Differential impact of adults and nymphs of a generalist predator on an exotic invasive pest demonstrated by molecular

gut-content analysis // Biol. Invasions. Vol. 11. P 895 – 903.

Hosseini R., Schmidt O., Keller M.A., 2008. Factors affecting detectability of prey DNA in the gut contents of invertebrate predators: a polymerase chain reaction-based method // Entomologia Experimentalis et Applicata. Vol. 126. P. 194–202.

Jansen J.P. Hautier L., 2008. Ladybird population dynamics in potato: comparison of native species with an invasive species, *Harmonia axyridis* // BioControl. Vol. 53. P. 223 – 233.

Juen A., Traugott M., 2005. Detecting predation and scavenging by DNA gut-content analysis: a case study using a soil insect predator-prey system // Oecologia. Vol. 142. P. 344 – 352.

King R.A., Read D.S., Traugott M., 2008. Molecular analysis of predation: a review of best practice for DNA-based approaches // Molecular Ecology. Vol. 17. P. 947 – 963.

King R.A., Vaughan I.P., Bell J.R. *et al.*, 2010. Prey choice by carabid beetles feeding on an earthworm community analysed using species- and lineage-specific PCR primers // Molecular Ecology. Vol. 19. P. 1721 – 1732.

Kuusik A.K., 2009. Molecular Tracking of Arthropod Predator-Prey Interactions. Doctoral Thesis. Uppsala. 68 p.

Lukhtanov V.A., Sourakov A., Zakharov E.V., Hebert P.N., 2009. DNA barcoding Central Asian butterflies: increasing geographical dimension does not significantly reduce the success of species identification // Molecular Ecology Resources. Vol. 9. P. 1302 – 1310.

Mansfield S., Hagler J. R., Whitehouse M.E. A., 2008. A comparative study on the efficacy of a pest-specific and prey-marking enzyme-linked immunosorbent assay for detection of predation // Entomologia Experimentalis et Applicata. Vol. 127. P. 199–206.

Roy H., Wajnberg E., 2008. From biological control to invasion: the ladybird

Harmonia axyridis as a model species // BioControl. Vol. 53. P. 1–4.

Rozen S., Skaletsky H.J., 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers // Krawetz S., Misener S. (eds.) Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology. P. 365 – 386.

Schmidt J.E.U., Almeida J.R.M., Rosati C., Arpaia S., 2009. Identification of trophic interactions between *Macrolophus caliginosus* (Heteroptera: Miridae) and *Myzus persicae* (Homoptera: Aphididae) using real time PCR // BioControl. Vol. 54. P. 383 – 391.

Simon S., Frati F., Beckenbach A. *et al.*, 1994. Evolution, Weighting, and Phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers // Annals of the Entomological Society of America. Vol. 87. N. 6. P. 651 – 701.

Sint D., Raso L., Kaufmann R., Traugott M., 2011. Optimizing methods for PCR-based analysis of predation // Molecular Ecology Resources, 11: no. doi: 10.1111/j.1755-0998.2011.03018.x

Sugonyaev E.S., 2009a. Principles and Methods of Rice Lepidopteroid Pest and its Enemy Management (PEM) Program in North Vietnam // Integrated Pest Management: Dissemination and Impact / Eds. R. Peshin, A.K. Dhawan. Springer Science, Business Media B.V. P. 383 – 384.

Sugonyaev E.S., 2009b. IPM Programs in Commonwealth of Independent States and Russia // Integrated Pest Management: Dissemination and Impact / Eds. R. Peshin, A.K. Dhawan. Springer Science, Business Media B.V. P. 455-479.

Sheppard S.K., Bell J.R., Sunderland K.D. *et al.*, 2005. Detection of secondary predation by PCR analyses of the gut contents of invertebrate generalist predators // Molecular Ecology. Vol. 14. P. 4461 – 4468.

Symondson W.O., Cesarini S., Dodd P.W. *et al.*, 2006. Biodiversity vs. biocontrol: positive and negative effects of alternative prey on control of slugs by carabid beetles // Bull. Entomol. Res. Vol. 96. N. 6. P. 637 – 645.

Szendrei Z., Greenstone M.H., Payton M.E., Weber D.C., 2010. Molecular gut-content analysis of a predator assemblage reveals the effect of habitat manipulation on biological control in the field // Basic and Applied Ecology. Vol. 11. P. 153 – 161.

Traugott M., Symondson W.O.C., 2008. Molecular analysis of predation on parasitized hosts // Bull Entomol Res. Vol. 98. N. 3. P. 223 – 231.

Tshernyshev W.B., Afonina V.M., Semenov A.N., Terehov Y.A., 2010. Possibility of contacts between arthropods active on the soil surface and on vegetation // IX European congress of Entomology programme and book of abstracts. Budapest. P. 239.

Weber D.C., Lundgren J.G., 2009. Detection of predation using qPCR: Effect of prey quantity, elapsed time, chaser diet, and sample preservation on detectable quantity of prey DNA // J. of Insect Science. Vol. 9. N. 41. 12 pp, available online: insectscience.org/9.41

Zaidi R.H., Jaal Z., Hawkes N.J. *et al.*, 1999. Can multiple-copy sequences of prey DNA be detected amongst the gut contents of invertebrate predators? // Molecular Ecology. Vol. 8. P. 2081 – 2087.

Zhang G.F., Lu Z.C., Wan F.H., 2007. Detection of *Bemisia tabaci* remains in predator guts using a sequence-characterized amplified region marker // Entomologia Experimentalis et Applicata. Vol. 123. P. 81 – 90.

Таблица 1.

Эффективность различных способов фиксации *Coleomegila maculata* при кормлении одним яйцом, анализ ПЦР в реальном времени (Weber, Lundgren, 2009).

№	Метод фиксации	% определения хищничества	Эквивалент яйца обнаруженный в хищнике (у.е.)*
1	Яйцо (положительный контроль), замороженное в этаноле	100	1,0000 ± 0,1233
2	Замораживание в этаноле (-20°C)	100	0,2284 ± 0,0571
3	Замораживание при -80° С	100	0,0604 ± 0,0207
4	Замораживание при -20° С	90	0,0279 ± 0,0051
5	Этанол комнатной температуры	80	0,0078 ± 0,0015
6	Антифриз (этиленгликоль 45%)	90	0,0071 ± 0,0013
7	СО ₂ , 4 ч.	22	0,0012 ± 0,0009
8	СО ₂ , 5 дней	0	0 ± 0
9	Голодный жук, замороженный в этаноле	0	0 ± 0

*Под эквивалентом следует понимать соотношение ДНК *Leptinotarsa decemlineata* в образцах из кишечника *Coleomegila maculata* к ДНК в образце, выделенном из одного яйца. Определялось при проведении ПЦР в реальном времени.

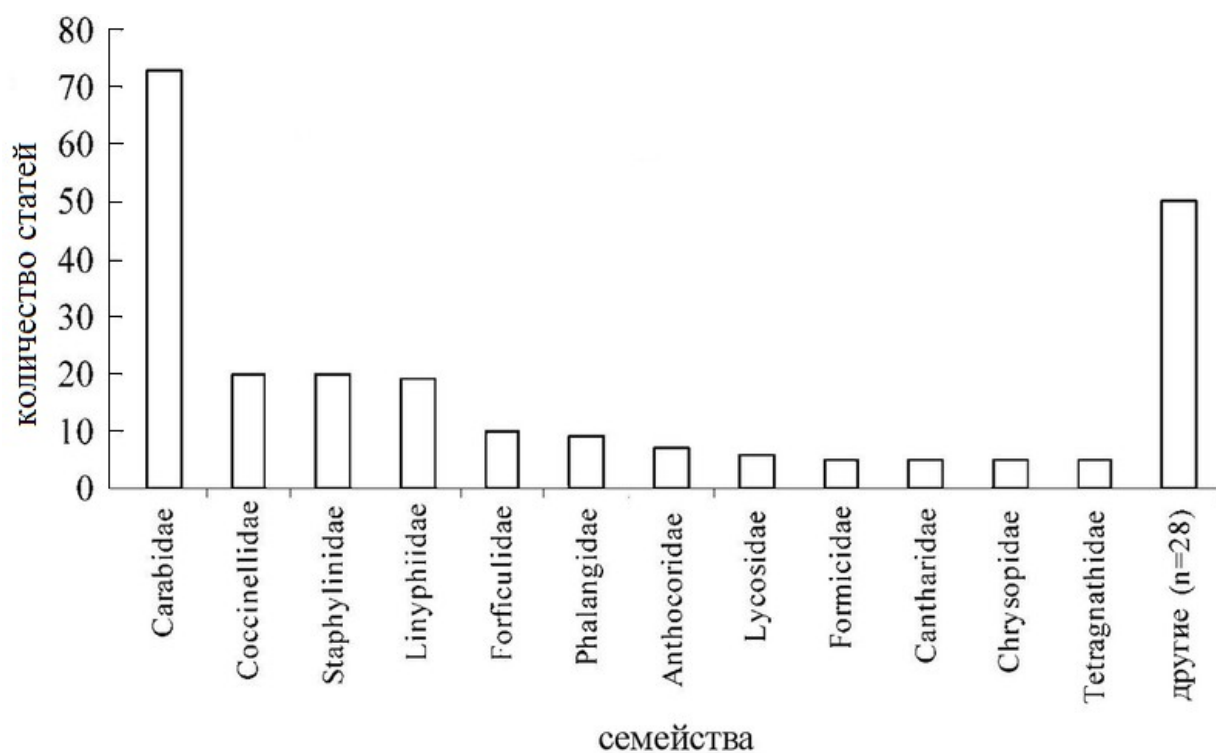


Рис. 1. Количество статей, посвященных обнаружению хищничества в отношении тлей (Aphididae), с использованием методов анализа содержимого кишечника представителей различных семейств насекомых (Harwood, Obrycki, 2005).

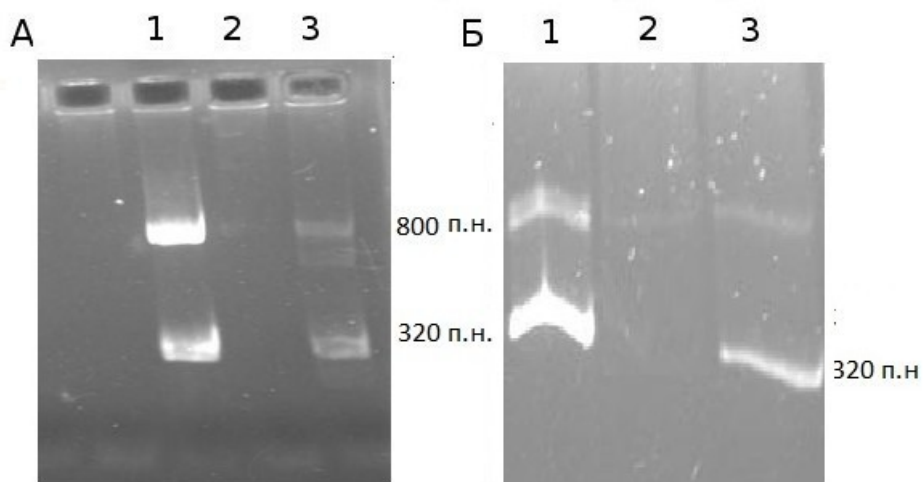


Рис. 2. Электрофорез в агарозном (А) и полиакриламидном (Б) геле продуктов амплификации с двумя парами видоспецифичных праймеров к мтДНК *Musca domestica*. 1 – положительный контроль, ДНК из личинки *M. domestica*. 2 – отрицательный контроль, ДНК из жирового тела *Harpalus rufipes*. 3 – ДНК из кишечника *H. rufipes*, питавшегося имаго *M. domestica*. В части А показан результат двух ПЦР с разными парами праймеров (фрагмент 320 п.н. – цитохромоксидаза I, 800 п.н. – цитохром b5). В части Б: нижний фрагмент – целевой продукт 320 п.н., верхний фрагмент – неспецифичный продукт.

**Это препринт статьи в научный журнал, до её рецензирования и правки редактором. Версия напечатанная в журнале может отличаться от препринта объемом приводимых данных, количеством страниц и т. д. Распространяется для ознакомления, для того чтобы посмотреть изданную статью зайдите на сайт журнала www.ecolgenet.ru*