

ПЦР – анализ трофических отношений в биомах.

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

Институт биохимии и генетики УНЦ РАН cordek@ya.ru

Существует большое количество методов исследования питания организмов, которые не позволяют получать данные сразу по множеству видов, составляющих биом. ПЦР – анализ является универсальным методом, который уже сейчас применяется в биоценологических исследованиях. С небольшими дополнениями он может применяться для анализа трофических взаимодействий.

Методы

Для ПЦР – анализа хищничества в отношении колорадского жука применялись праймеры к митохондриальному гену *cox1* (длина продукта 215 п.н.). Праймеры видоспецифичны и амплификация идет только с ДНК колорадского жука. Праймеры для комнатной мухи разрабатывали по последовательности ДНК митохондриальных генов *cox1* и *cb5*, с продуктами разной длины (300 и 800 п.н. соответственно).

Анализировали несколько хищных видов семейства жужелицы (Carabidae): *Pterostichus niger*, *P. melanarius*, *Harpalus rufipes*, *Dolychus halensis*. Образцы ДНК для анализа выделялись из кишечника и экскрементов хищников.

В лаборатории жужелиц кормили личинками колорадского жука, а затем личинками мухи. Экскременты собирали раз в сутки. Выделяли ДНК гуаидинтиоционатом и фенол-хлороформной экстракцией.

Рис. 2. Результат амплификации образцов ДНК из экскрементов жужелиц, кормленных сначала личинками колорадского жука, а затем личинками мухи.

А – праймеры к *cox1*, *L. decemlineata* (215 н.п.). В – праймеры к *cox1* *M.domestica* (300 н.п.).

1-3 экскременты через 1 сутки, 4-6 экскременты через 2 суток, 7-9 экскременты через 3 суток, 10-13 экскременты через 4 суток.

Результаты

Анализ образцов ДНК, выделенных из кишечника жужелиц, питавшихся личинками комнатной мухи, показал высокую сохранность небольших последовательностей митохондриальной ДНК. Сравнение двух пар праймеров с разной длиной амплифицируемого продукта, показывает, что короткие фрагменты (300 п.н.) определяются в течении 24-32 часов, а длинные (800 п.н.) в течении 8 часов (рис.1.).

Анализ образцов ДНК из экскрементов *P.niger* с праймерами для колорадского жука, показывает, что остатки личинок колорадского жука перестают попадаться в экскрементах на третьи сутки после кормления (рис.2. А).

Анализ тех же образцов показывает появление остатков личинок мухи в экскрементах на третьи сутки после начала кормления (рис.2.В).

Рис. 3. анализ образцы ДНК из *C. septempunctata*. 1-9 ДНК из кишечника, 10 – ДНК из *L. decemlineata*

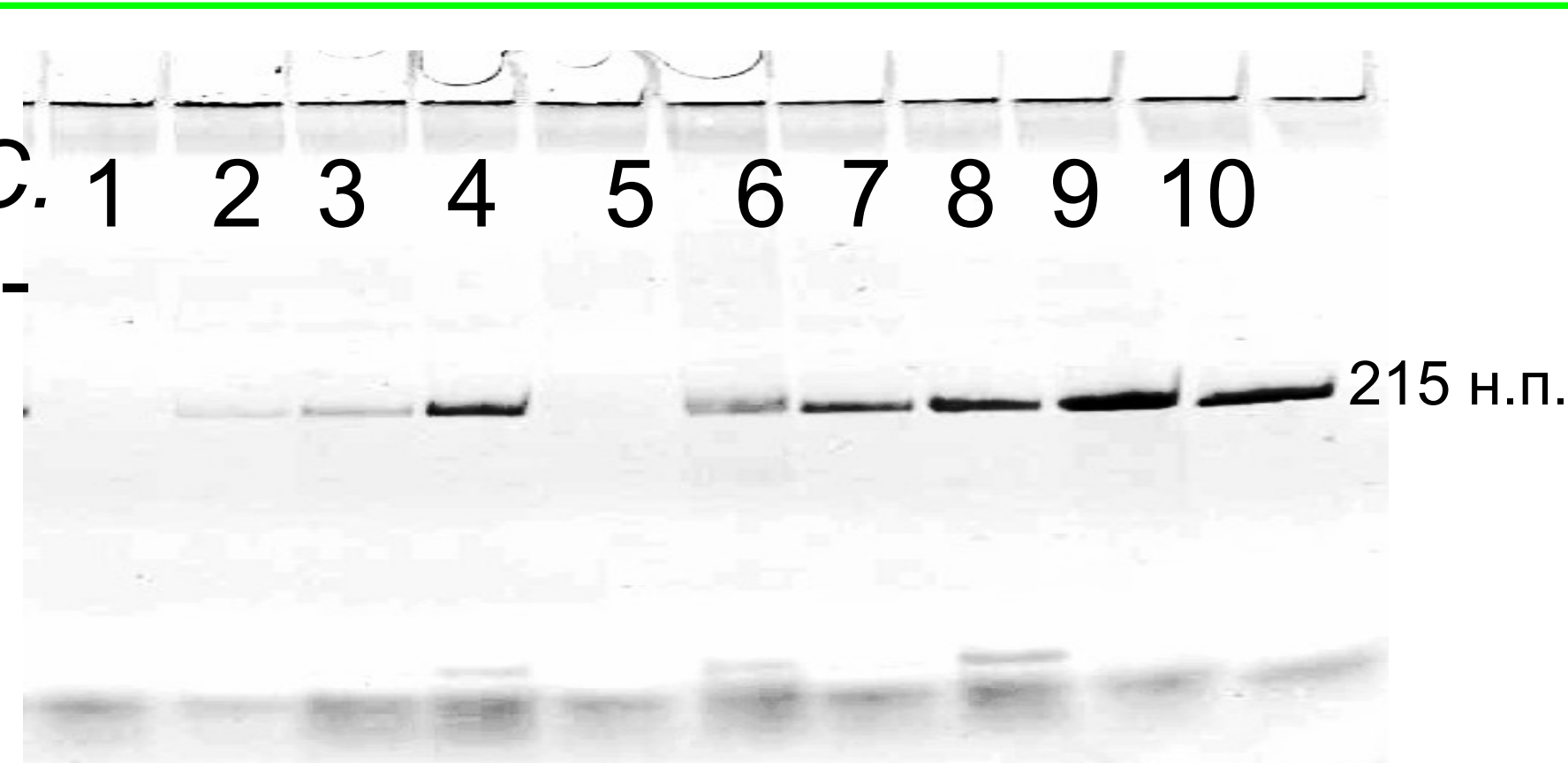
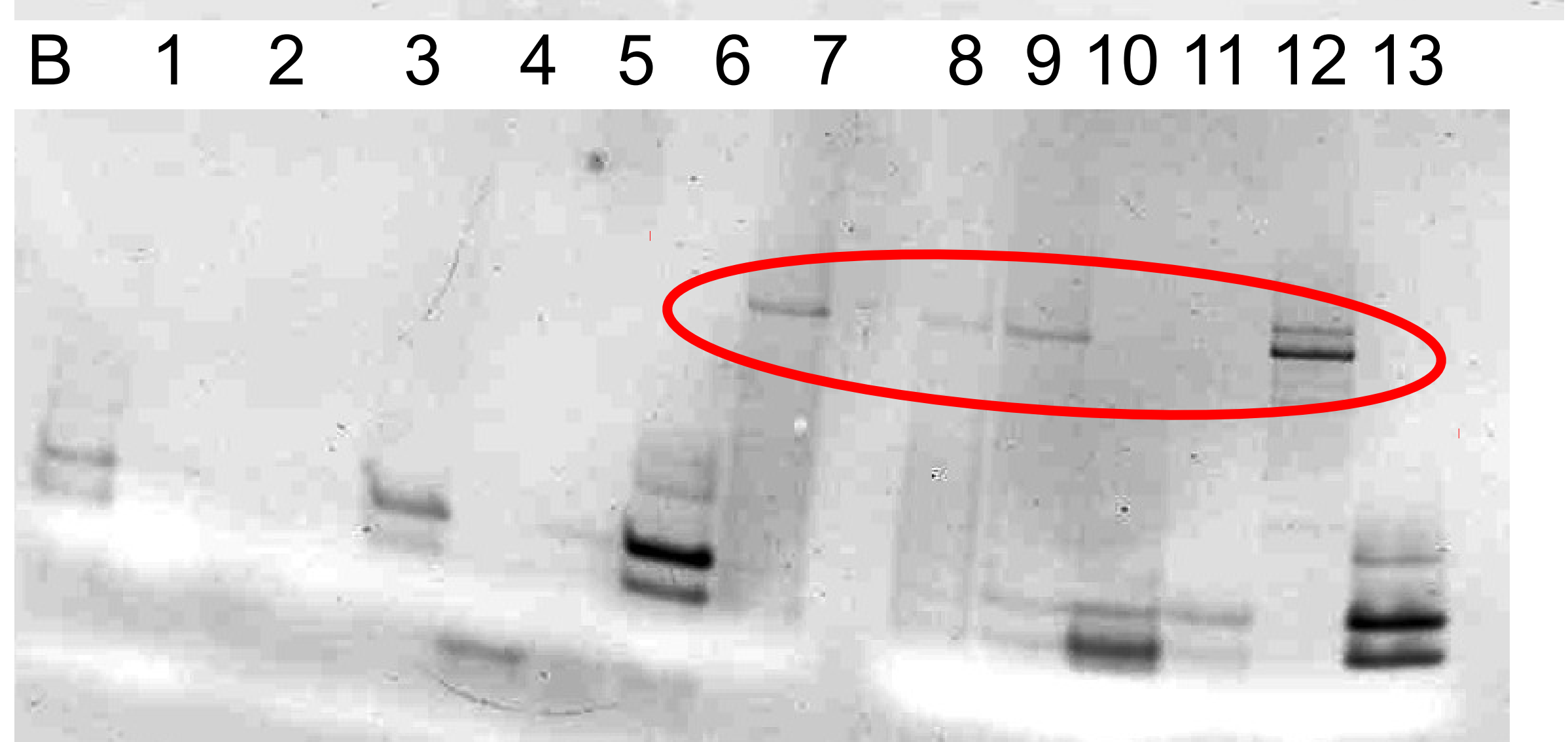
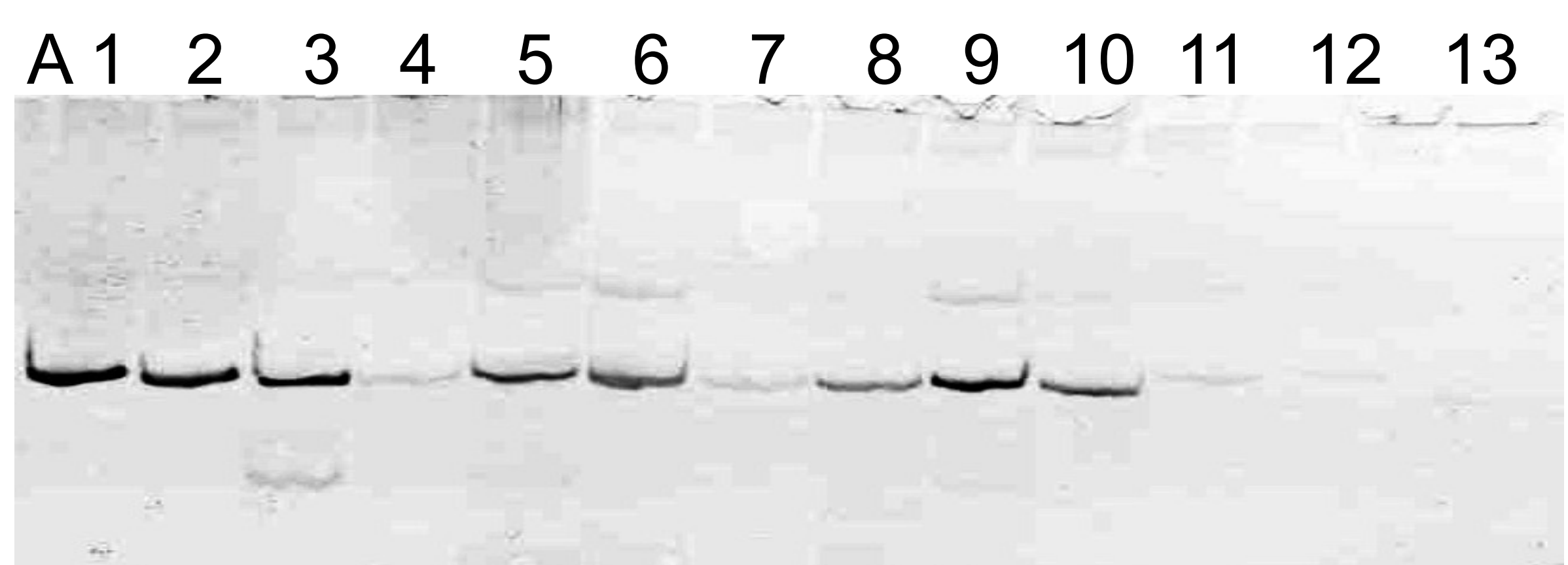
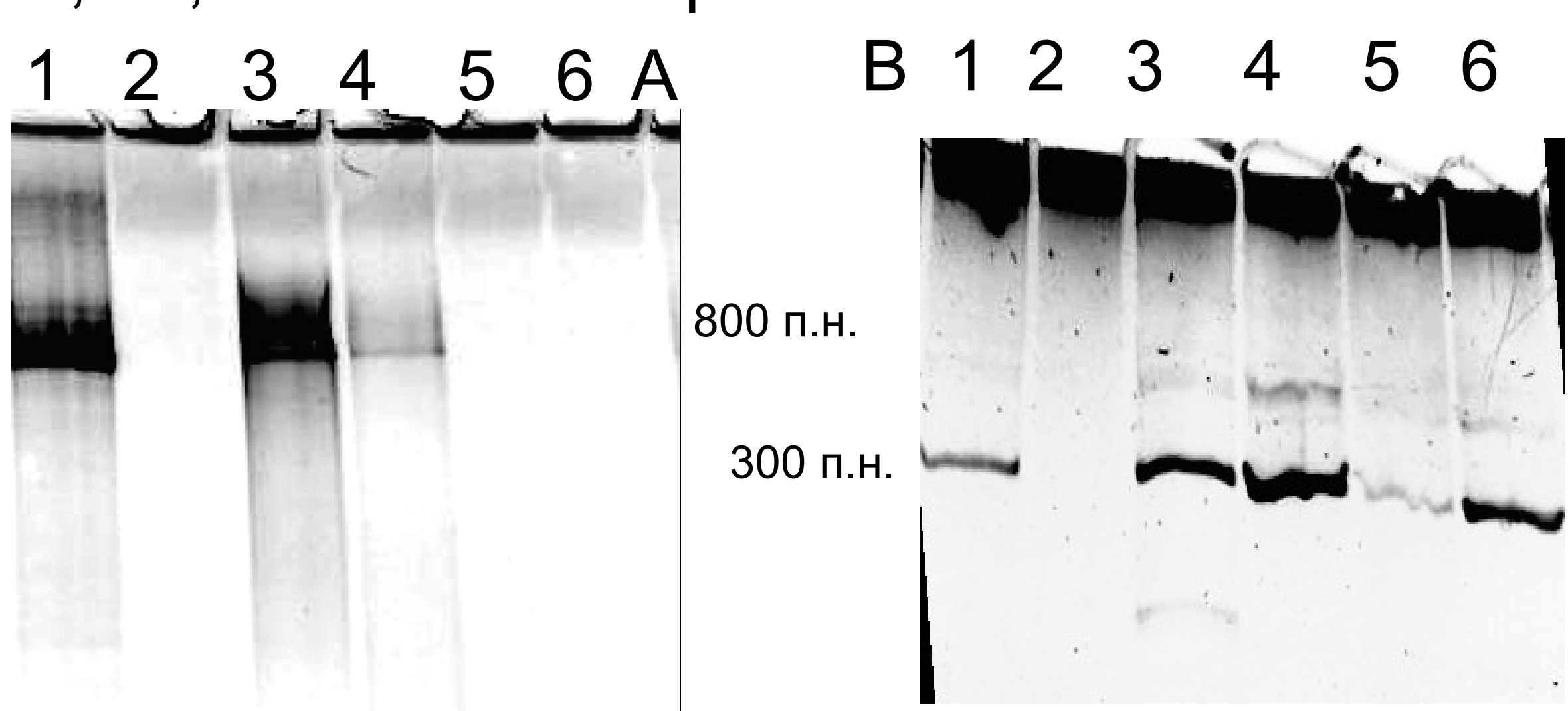


Рис.1. Результат амплификации образцов ДНК полученных из кишечника жужелиц, кормленных личинками мухи.

А – праймеры к *cb5*, фрагмент 800 н.п.

В – праймеры к *cox1*, фрагмент 300 н.п.

1. контроль положительный, ДНК из личинки мухи. 2. контроль отрицательный, ДНК из жирового тела жужелицы. 3 – 6. ДНК из кишечника жужелиц, фиксированных через 1, 8, 16, 32 ч. после кормления



Сохранность ДНК колорадского жука в кишечнике хищников отличается у разных видов, но в среднем больше 24 часов, поэтому можно применять метод для анализа хищников, собранных в полевых условиях, и определять их среднесуточную активность.

Исследование образцов ДНК из кишечника жужелиц и божьих коровок, собранных в естественных условиях в картофельных агроценозах, показывает высокую хищническую активность семиточечной божьей коровки (*Coccinella septempunctata*) в отношении колорадского жука (рис. 3). Небольшую активность проявляют *H. rufipes* и *P. Melanarius*.

Работа поддержана грантами РФФИ № 09-04-00391-а, 11-04-01886-а и 11-04-97022-р_поволжье_а