

РАЗРАБОТКА МЕТОДА ВЫДЕЛЕНИЯ ГЕНОМНОЙ ДНК ИЗ ПУПАРИЙ ЮЖНОАМЕРИКАНСКОЙ ТОМАТНОЙ МОЛИ *TUTA ABSOLUTA* (POVOLNY)

Гриценко Д.А.¹, Хамдиева О.Х.², Динасилов А.С.³, Динасилова Г.А.⁴

¹Гриценко Диляра Александровна – PhD докторант;

²Хамдиева Озада Хакимовна – PhD докторант;

³Динасилов Алмат Саламатович - кандидат сельскохозяйственных наук;

⁴Динасилова Гульшахар Ашимовна - старший лаборант,

Испытательный центр фитосанитарного лабораторного анализа,

Казахский научно-исследовательский институт защиты и карантина растений, г. Алматы, Республика Казахстан

Аннотация: в статье описывается разработанный метод выделения ДНК из личинок насекомых и его апробация на образцах южноамериканской томатной моли *Tuta absoluta* (Povolny). Метод основывается на кипячении образца личинки с последующим осаждением ДНК с помощью ацетата калия и этанола. Качество выделенной ДНК было анализировано с помощью ПЦР и секвенирования.

Ключевые слова: южноамериканская томатная моль, выделение ДНК, амплификация, секвенирование.

Введение. *Tuta absoluta* (Povolny) - южноамериканская томатная моль, является карантинным видом насекомых в Республики Казахстан, несмотря на то, что свое происхождение ведет из Южной Америки [1-5]. В основном, моль поражает томат, но способна поражать картофель, баклажан и перец [6-10]. Для успешной борьбы с вредителем необходимо своевременное его обнаружение с помощью высокочувствительных методов, таких как ПЦР, ИФА, гибридизационные методы или секвенирование маркерных регионов для идентификации вида (1 субъединица цитохромоксидазы (COI) а также геномные маркеры (ITS1, ITS2)). Каждый из вышеуказанных методов, кроме ИФА, требует выделение геномной ДНК вредителя. Такие методы как обнаружение с помощью ПЦР в реальном времени, требуют высокой чистоты ДНК, так как загрязнение образца приводит к ингибированию реакции и выдаче ложноотрицательных результатов. В настоящий момент, помимо использования дорогих коммерческих наборов для выделения ДНК из насекомых, существует несколько классических методов выделения ДНК, широко используемых в лабораториях для исследовательских целей. Первый метод включает использование цетилтриметиламмоний бромид (ЦТАБ/СТАВ), второй метод включает использование детергента гуанидинаизотиоционата (GITC) с последующей сорбцией на силике [11-14]. СТАВ селективно связывается с ДНК и способствует образованию нерастворимого комплекса, при этом белки и углеводы остаются в растворимой фазе. В дальнейшем ДНК восстанавливается из комплекса хлоридом натрия. Гуанидинизотиоционат участвует в денатурации белков, дисагрегации клеточных структур и способствует удалению белков связанных с нуклеиновыми кислотами. Кроме того, GITC способствует связыванию нуклеиновых кислот с частицами диоксида кремния (силика, диатомовая земля), что в разы повышает эффективность выделения ДНК. Вышеуказанные методы широко используются для выделения ДНК из насекомых с целью дальнейшего анализа, но каждый из них имеет ряд преимуществ и недостатков. Использование цетилтриметиламмоний бромид приводит к быстрому выделению ДНК, с сохранением целостности ДНК без использования токсичных веществ как фенол. Главным недостатком данной методики является низкая концентрация выделенной ДНК с частым загрязнением образца. Выделение ДНК из насекомых, содержащих большое количество фенолов или танинов, приводит к значительному загрязнению образца с последующей непригодностью для дальнейшего анализа ДНК образца. В виду чего, к СТАВ добавляется в большей концентрации поливинилпирролидон. Кроме того, предотвращение окисления ДНК может быть осуществлено добавлением аскорбиновой кислоты, диэтилдитиокарбаминовой кислоты либо 2-меркаптоэтанола. Метод, основанный на использовании GITC, является высокоэффективным, но длительным по времени и требует множество промываний с целью удаления GITC, который участвует в значительных потерях ДНК. Данный метод используется при наличии большого количества образцов, из которого подразумевается выделение ДНК. Преимущество данного метода проявляется главным образом в чистоте и целостности выделенной ДНК [15-17]. В данной работе был разработан метод выделения ДНК из личинок насекомых и апробирован на образцах томатной минирующей моли. Метод основывается на кипячении образца личинки с последующим осаждением ДНК с помощью ацетата калия и этанола. Качество выделенной ДНК было анализировано с помощью ПЦР и секвенирования.

Материалы и методы: Все реактивы, использованные в работе, были производства Sigma-Aldrich, Thermo Scientific с категорией чистоты «Для молекулярной биологии». Пупарии моли были собраны в Южно-Казахстанской области с трех разных локальных регионов (разные частные фермы). Образцы, маркированные как 1-10, были собраны в регионе А. Образцы с 11-20 были собраны в регионе Б и с 20-30 в регионе В.

Выделение ДНК из пупарий моли с помощью СТАВ метода: ДНК из 10-ти образцов региона В были выделены методом СТАВ. Метод выделения ДНК с помощью СТАВ, является наиболее распространенным методом в экстракции ДНК из насекомых с множеством различных его модификаций [18-19]. В данной работе, ДНК выделялась из 10 образцов (пупарий). Один пупарий моли растирался с помощью пестика в ступке с добавлением буфера для экстракции. Буфер для экстракции предварительно нагревали при 65°C в течении 20 минут. Буфер для экстракции содержал: 20 mM ЭДТА- pH 8,0 (этилендиаминтетрауксусная кислота), 100 mM Трис (доведенный соляной кислотой до pH 7,5), 1.4 M NaCl, 2% СТАВ, 4% PVP (поливинилпирролидон). Бета-меркаптоэтанол (2%) добавлялся в аликвоту буфера перед использованием. Растертый образец выдерживался в водяной бане в течение 30 минут при 65°C с периодическим встряхиванием на вортексе. Далее экстракт охлаждали до комнатной температуры, после чего добавляли РНКазу и инкубировали в течение часа при 37°C. Далее добавляли 1 объем смеси хлороформ: изоамиловый спирт (24:1) с последующим центрифугированием в течение 15 минут при 13 тыс. оборотов. После центрифугирования отбиралась водная фаза, которая очищалась повторным добавлением смеси хлороформ: изоамиловый спирт. В отобранную водную фазу добавлялся 96% спирт в размере 2 объемов с последующей инкубацией при -20°C в течение 5-20 часов. После инкубации проводили осаждение путем центрифугирования при 13 тыс. оборотов в течение 15 минут. Далее осадок промывали 75% спиртом. Промытый осадок ДНК высушивали при комнатной температуре и разводили в 50 мкл дистиллированной воды. Далее ДНК проверялось на качество с помощью спектрометрических методов. Выделенная ДНК также была использована для баркодирования (определение видовой принадлежности).

Выделение ДНК из пупарий моли с помощью метода основанного на использовании детергента гуанидин изотиоционата (GITC). ДНК выделялась из 10 образцов (пупариев) региона А. Один пупарий моли растирался в одноразовом эпендорфе с помощью одноразового пластмассового пестика в 100 мкл лизирующего раствора (4M GITC и 50mM Трис). Далее гомогенная масса выдерживалась при 65°C в течение часа. После инкубации к образцу добавлялась протеинкиназа К в концентрации 0.1 мг/мл и 3 мкл РНКазы (10 мг/мл), образец выдерживался при 37°C в течение часа. После чего, к образцу была добавлена силика в размере 20 мкл из набора реагентов Проба-ГС (Агродиагностика) с последующим выдерживанием в течение 20 минут при 65°C с периодическим перемешиванием. Далее, силика осаждалась при 10 тыс. оборотов в течение 1 минуты. Промывание силики от GITC проводили дважды с помощью промывочного раствора содержащего 75% этанол. Третье промывание было осуществлено с помощью ацетона. После каждого промывания силика осаждалась путем центрифугирования в течение 1 минуты при 10 тыс. оборотов. После последнего промывания, ацетон был слит, а осадок силики, связанной с ДНК, высушивался при 50°C в течение 5 минут. Далее осадок разводили в 40 мкл бидисциплированной воды. Далее ДНК проверялось на качество с помощью спектрометрических методов. Выделенная ДНК также была использована для баркодирования (определение видовой принадлежности).

Выделение ДНК из пупарий моли с помощью метода кипячения: Для выделения ДНК было выбрано 10 пупарий региона В. Каждый пупарий гомогенизировался в 100 мкл бидисциплированной воды. Далее гомогенат кипятился в водяной бане при 100°C в течение 20 минут. После кипячения пробирка с образцом помещалась в лед и выдерживалась в течение 10 минут. Быстрое охлаждение необходимо было для предотвращения разрушения ДНК ферментами. Далее к образцу добавлялась протеинкиназа К в концентрации 0.1 мг/мл и образец выдерживался в термоблоке в течение часа при 37°C. После инкубации с протеинкиназой К проводили осаждение комплексов, содержащих разрушенные клеточные структуры а также разрушенную личиночную шкурку. Центрифугирование проводили при 5 тыс. оборотов в течение 10 минут. Далее отбирали водную фазу и к ней добавляли 1/10 объема ацетата калия и 3 объема 96% спирта. Полученную смесь хорошо перемешивали и выдерживали в течение 30 минут при -80°C. Далее проводили осаждение ДНК центрифугированием при 13 тыс. оборотов в течение 20 минут. Далее осадок промывали 75% спиртом и сушили. Осадок разводили в 40 мкл воды. Далее ДНК проверялось на качество с помощью спектрометрических методов. Выделенная ДНК также была использована для баркодирования (определение видовой принадлежности).

Амплификация COI гена с помощью универсальных праймеров: Выделенная разными методами ДНК из 30 образцов была использована в амплификации COI гена с помощью универсальных праймеров LCO 1490(GGTCAACAATCATAAAGATATTGG) и HCO

2198 (TTAАСТTCAGGGTGACCAАААААТCA) [20]. Амплификацию проводили в 25 мкл содержащих буфер полимеразы (20 mM Tris HCl, pH 8.8, 10 mM (NH₄)₂SO₄, 10 mM KCl, 1 мг/мл BSA, 0,1% TritonX-100), 2.5 mM MgSO₄, 0.2 mM дНТФ, 2 mM каждого праймера, 2,5 ед. Таq-полимеразы и 30 нг геномной ДНК. Программа амплификации включала следующие этапы: 1 этап: 94°C -2 мин 00 сек; циклы: 94°C - 20 сек, 56°C – 30 сек, 72°C - 1 мин, 30 циклов; финальная амплификация 72°C -10 мин. Результаты амплификации оценивались в 1% агарозном геле.

Амплифицированные COI были анализированы методом секвенирования при использовании прямого и обратного праймера по-отдельности. Секвенирование проводили с использованием набора реагентов

Big Dye Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Kit, POP-4® полимера на секвенаторе ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Анализ полученных данных обрабатывался с помощью программы Sequencing Analysis Software v 5.3.1.

Секвенированные последовательности загружались в международную базу данных по баркодированию BOLD с последующей идентификацией вида.

Результаты исследования. В данной работе было выделено ДНК из 30 пупарий при использовании трех разных методов. Результаты спектрометрического анализа показали, что наибольшая концентрация ДНК была получена при использовании СТАВ метода, но при этом загрязнение ДНК было очень сильным. Среднеарифметическое соотношение $A_{260}: A_{280}$ составило 1.75. Среднеарифметическая концентрации ДНК составило 200 нг/мкл. Выделение 10 образцов с помощью метода использующего GITC с силикой показало получение ДНК со среднеарифметическим соотношением $A_{260}: A_{280}$ в 1,9 и со среднеарифметической концентрацией ДНК около 100 нг/мкл. Выделение ДНК с помощью метода кипячения показало среднеарифметическую концентрацию в 150 нг/мкл и соотношение $A_{260}: A_{280}$ в 1,9. Целостность ДНК из 30 образцов была проверена путем анализирования ДНК в 1% агарозном геле (рисунок 1).

Как видно из рисунка 1, образцы ДНК выделенные с помощью СТАВ метода показали наличие разрушенной ДНК в виде протяженных шлейфов.

Амплификация гена COI и секвенирование: Выделенная ДНК использовалась в ПЦР с последующим секвенированием. Условия проведения ПЦР для 30 образцов были одинаковыми, и амплификация проводилась в одном и том же амплификаторе при использовании одной программы.

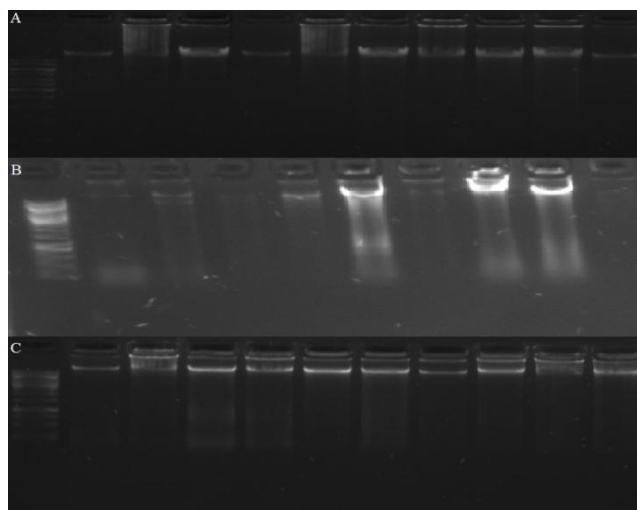


Рис. 1. Электрофореграмма выделенных образцов ДНК

А – ДНК, выделенная из пупарий моли с помощью метода, основанного на использовании детергента гуанидинаизотиоционата (GITC);

В – ДНК, выделенная из пупарий моли с помощью СТАВ метода;

С – ДНК, выделенная из пупарий моли с помощью метода кипячения

Как видно на рисунке 2, у 3-х образцов ДНК, выделенных СТАВ методом, не было обнаружено целевых амплифицированных фрагментов в размере 700 пар нуклеотидов.

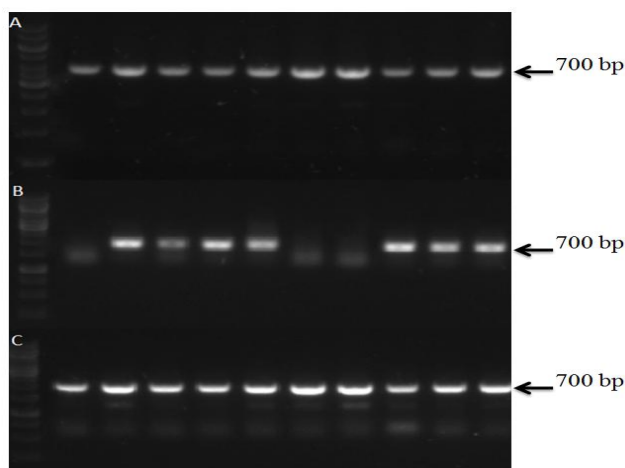


Рис. 2. Результаты электрофореза амплифицированного фрагмента гена COI.
 А – Продукты ПЦР после выделения методом, основанным на использовании детергента гуанидинаизотиоционата (GITC);
 В - Продукты ПЦР, выделенных с помощью СТАВ метода;
 С - Продукты ПЦР, выделенных с помощью метода кипячения

Отсутствие продуктов амплификации возможно из-за деградации геномной ДНК или наличия большого количества ингибиторов. Необходимый продукт амплификации был получен при использовании в роли матрицы ДНК образцов, выделенных с помощью GITC и кипячения. Концентрация ДНК, используемая в роли матрицы, составила 30 нг для каждого образца ДНК для анализа с помощью ПЦР. Для секвенирования каждый образец ДНК брался в концентрации 20 нг/мкл. Концентрация каждого праймера для секвенирования составила 3.3 нМ/мкл. Результаты секвенирования были анализированы с помощью программы Sequencing Analysis Software v 5.3.1, качество секвенирования было высоким, все нуклеотиды дали пик флуоресценции, необходимый для идентификации. Просеквенированные COI 27 образцов были анализированы с помощью модуля сравнения последовательностей в международной базе данных по баркодированию BOLD. Результаты анализа в базе данных показали принадлежность исследуемых 27 образцов к виду *Tuta absoluta* с точностью не менее 98%.

Заключение: Для качественной диагностики необходимо ответственно соблюдать все этапы, необходимые для обнаружения вредителя. Диагностика при использовании молекулярных методов, как правило, включает на первом этапе выделение ДНК/РНК, далее анализ нуклеиновой кислоты с помощью ПЦР анализа, секвенирования, гибридизация. В данной работе был апробирован быстрый и качественный метод выделения геномной ДНК из пупарий южноамериканской томатной моли. Анализ ДНК с помощью ПЦР с последующим секвенированием показал пригодность данного метода для молекулярной диагностики. Широко используемый метод СТАВ показал свою эффективность только в 70% случаев. Метод выделения геномной ДНК при использовании GITC, по качеству выделенной ДНК не уступает методу кипячения. Кроме того, в работе было показано, что 27 образцов были идентифицированы как *Tuta absoluta* с вероятностью не менее 98% при использовании международной базы по баркодированию.

Список литературы

1. Durić Z., Delić D., Hrnčić S., Radonjić S. Distribution and molecular identification of *Tuta absoluta* (Meyrick, 1917) (Lepidoptera, Gelechiidae) populations in Bosnia and Herzegovina and Montenegro//Polish Journal of Entomolog., 2014. V. 83. P. 121-129.
2. Cifuentes D., Chynoweth R., Bielza P. Genetic study of Mediterranean and South American populations of tomato leafminer *Tuta absoluta* (Povolny, 1994) (Lepidoptera: Gelechiidae) using ribosomal and mitochondrial markers. Pest Manag Sci., 2011. V. 67 (9):1155-62.
3. Guillemaud T., Blin A., Le Goff I., Desneux N., Reyes M., Tabone E., Tsagkarakou A., Niño L., Lombaert E. The tomato borer, *Tuta absoluta*, invading the Mediterranean Basin, originates from a single introduction from Central Chile. Sci Rep., 2015. Feb. 10;5:8371.
4. Tonnang H.E., Mohamed S.A., Khamis F., Ekesi S. Identification and Risk Assessment for Worldwide Invasion and Spread of *Tuta absoluta* with a Focus on Sub-Saharan Africa: Implications for Phytosanitary Measures and Management. PLoS One, 2015 Aug. 7; 10(8):e0135283.
5. Urbaneja A., González-Cabrera J., Arnó J., Gabarra R. Prospects for the biological control of *Tuta absoluta* in tomatoes of the Mediterranean basin. Pest Manag Sci, 2012. Sep.; 68(9):1215-22.
6. Nannini M., Atzori F., Pesci R., Sanna F. NATIVE LARVAL PARASITOIDS ASSOCIATED WITH *TUTA ABSOLUTA* (MEYRICK) IN GREENHOUSE TOMATO CROPS OF SOUTHERN SARDINIA. CommunAgricApplBiol Sci, 2014;79 (2):199-203.
7. Ferracini C., Ingegno B.L., Navone P., Ferrari E., Mosti M., Tavella L., Alma A. Adaptation of indigenous larval parasitoids to *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae) in Italy. J Econ Entomol., 2012 Aug.; 105 (4):1311-9.
8. Marchiori C.H., Silva C.G., Lobo A.P. Parasitoids of *Tuta absoluta* (Meyrick, 1917) (Lepidoptera: Gelechiidae) collected on tomato plants in lavras, State of Minas Gerais, Brazil. Braz J Biol., 2004 Aug.; 64(3A):551-2.
9. Chailleux A., Biondi A., Han P., Tabone E., Desneux N. Suitability of the pest-plant system *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae)-tomato for Trichogramma (Hymenoptera: Trichogrammatidae) parasitoids and insights for biological control. J Econ Entomol., 2013 Dec ;106 (6):2310-21.
10. Nannini M., Foddi F., Manca L., Pesci R., Sanna F. Biological agents for whitefly control in Sardinian greenhouse tomatoes. CommunAgricApplBiol Sci, 2009; 74 (2):363-73.

11. *Chen H., Rangasamy M., Tan S.Y., Wang H. and Siegfried B.D.*, 2010. Evaluation of Five Methods for Total DNA Extraction from Western Corn Rootworm Beetles. PLoS ONE.
12. *Gilbert M.T.P., Moore W., Melchior L. and Worobey M.*, 2007. DNA Extraction from Dry Museum Beetles without Conferring External Morphological Damage. PLoS ONE.
13. *Garipey T.D., Kuhlmann U., Gillott C. and Erlandson M.*, 2007. Parasitoids, Predators and PCR: The Use of Diagnostic Molecular Markers in Biological Control of Arthropods. Journal of Applied Entomology.
14. *Tian E.-W. and Yu H.*, 2013. A Simple and Rapid DNA Extraction Protocol of Small Insects for PCR Amplification. Entomological News, 123, 303-310.
15. *Musapa M., Kumwenda T., Mkulama M., Chishimba S., Norris D.E., Thuma P.E. and Mharakurwa S.*, 2013. A Simple Chelex Protocol for DNA Extraction from Anopheles spp. Journal of Visualized Experiments, 71, e3281.
16. *David P., Caroline W., Graeme F., Sandra L.K., Richard F.P. and Terence A.B.*, 2013. Absence of Ancient DNA in Sub-Fossil Insect Inclusions Preserved in “Anthropocene” Colombian Copal. PLoS One, 8, e73150.
17. *Nancy C.-C., Mauricio Q., Horacio C.-C. and Guadalupe Z.-P.*, 2010. A Simple and Rapid Method for DNA Isolation from Xylophagous Insects. International Journal of Molecular Sciences. 11, 5056-5064.
18. *Behura S.K.*, 2006. Molecular Marker Systems in Insects: Current Trends and Future Avenues. Molecular Ecology. 15. 3087-3113.
19. *Paul C.*, 2010. Bugs and Drugs Part 1: New Alternative Medicine for 21st Century. Alternative Medicine Review. 15. 124-135.
20. *Lobo J., Costa P.M., Teixeira M.A., Ferreira M.S., Costa M.H., Costa F.O.* Enhanced primers for amplification of DNA barcodes from a broad range of marine metazoans. BMC Ecol., 2013. Sep. 10; 13:34. doi: 10.1186/1472-6785-13-34.