

УДК 595.773.1.08

DOI:10.52419/issn2072-2419.2023.4.206

К ВОПРОСУ ОБ ИДЕНТИФИКАЦИИ МНОГОЯДНОЙ МУХИ-ГОРБАТКИ *MEGASELIA SCALARIS* (LOEW)

Жмуркина П.С.^{1*} – магистрант 1 курса факультета ветеринарно-санитарной экспертизы; Будович М.В.² – гл. агроном отдела молекулярных исследований Северо-Западной испытательной лаборатории; Карпенко А.А. – магистрант 1 курса факультета ветеринарно-санитарной экспертизы; Калюжная Т.В. – канд. ветеринар. наук, доц. кафедры ветеринарно-санитарной экспертизы (ORCID 0000-0002-8682-1840); Орлова Д.А. – канд. ветеринар. наук, доц. кафедры ветеринарно-санитарной экспертизы (ORCID 0000-0002-8163-8780).

¹ ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины»

² ФГБУ Северо-Западный филиал «Федеральный центр охраны здоровья животных»

*pannyteam@yandex.ru

Ключевые слова: Многоядная муха-горбатка, секвенирование, генетическая дистанция, ДНК-баркодирование, ПЦР, карантинные объекты.

Keywords: Ant-decapitating flies, sequencing, genetic distance, DNA barcoding, PCR, quarantine facilities.

Поступила: 04.10.2023

Принята к публикации: 17.11.2023

Опубликована онлайн: 08.12.2023



РЕФЕРАТ

Многоядная муха-горбатка (лат. *Megaselia scalaris* (Loew)) является карантинным объектом в Российской Федерации и внесена в Единый перечень карантинных объектов Евразийского экономического союза, утвержденный Решением Совета Евразийской экономической комиссии от 30.11.2016 № 158, т.к. является переносчиком опасных заболеваний, несущих большой экономический ущерб. Ареал охватывает большие территории Северной Америки, Африки, южной части Европы, Австралии, Юго-Восточной Азии, а также европейскую часть России, а именно Южный федеральный округ и республика Крым. Перечень подкарантинной продукции, подлежащей исследованиям с целью выявления *M. scalaris* (Loew) очень обширный, а точная идентификация до вида полученных образцов энтомологическим методом по морфологическим признакам копулятивных органов затруднена. Поэтому для идентификации разработаны методы молекулярной диагностики, а именно сравнение исследуемой нуклеотидной последовательности с референсной, с помощью базы NCBI и определение генетических дистанций. Исследования проводили в отделе молекулярных исследований Северо-Западной испытательной лаборатории ФГБУ «ВНИИЗЖ». В работе использовалось 6 образцов рода *Megaselia*. На первом этапе выделяли ДНК при помощи наборов «ДНК-Экстрен 2». Затем генетические маркеры получали методом классической ПЦР с последующей детекцией с помощью электрофореза, используя прибор T100 Thermal Cycler, секвенировали на генетическом анализаторе 3500 Genetic Analyzer. Идентификацию проводили путем сравнения полученной последовательности в программе BioEdit при помощи базы NCBI и путем расчета генетических дистанций, используя двухпараметрическую модель Кимуры и модель Тадзимы-Нея. В ходе исследования были выявлены преимущества и недостатки представленных методов молекулярной идентификации.

ВВЕДЕНИЕ / INTRODUCTION

Многоядная муха-горбатка (лат. *Megaselia scalaris* (Loew)) - мелкое насекомое из семейства двукрылых (Diptera), внесенное в Единый перечень карантинных объектов Евразийского экономического союза, утвержденный Решением Совета Евразийской экономической комиссии от 30.11.2016 № 158. *M. scalaris* (Loew) - переносчик чумы пчёл, холеры, а также зарегистрированы случаи кишечных миазов [1] при поедании растительной продукции, на которой паразитировали личинки многоядной мухи-горбатки, т.к. являются неспецифическими полифагами. Имаго имеет желтоватое или коричневатое тело, черные глаза и длина ее составляет 2–3 мм. Грудь горбовидная, крупная. Поперечные жилки на крыльях отсутствуют. В передней части крыла развиты так называемые «толстые жилки», костальная жилка с костальными ресничками тянется до половины крыла. Передвигаются преимущественно прерывистыми перебежками [2,3].

Ареал охватывает большие территории Северной Америки, Африки, южной части Европы, Австралии, Юго-Восточной Азии, а также европейскую часть России, а именно Южный федеральный округ и республика Крым. *M. scalaris* развиваются на широком спектре разлагающихся органических материалов растительного и животного происхождения (в т. ч. на навозе и падали), а также на живых растениях, грибах, на ранах животных. Возможен завоз вместе с сухим материалом растительного и животного происхождения и вместе с почвой для посадки. Из всего выше сказанного можно сделать вывод, что данный вид имеет множество путей распространения и постепенно становится космополитом [1,4].

M. scalaris (Loew) идентифицируют в стадии имаго по самцам, исследуя гипопигий – конец брюшка, несущий копулятивный орган. Так как не всегда полученный образец является самцом в стадии имаго, а именно это может быть самка в стадии имаго, яйцо, личинка, куколка, предкуколка, пупарий, точная идентифи-

кация до вида энтомологическим методом не всегда возможна [5]. Поэтому метод ДНК - штрихкодирования (ДНК-баркодинга), является более информативным.

По используемой внутри организации методике (03-2015 МР ВНИИКР), идентификация основывается на сравнении сходства исследуемой нуклеотидной последовательности с референсной, с помощью базы NCBI (информационный ресурс национального центра биотехнологической информации, реализованный в сети Интернет (Генбанк)), учитывая 2 критерия: % покрытия последовательностей (для используемой в работе праймерной системы должен превышать 95%) и % идентичности последовательностей (для праймерной системы LCO1490/НСО2198 >95%). Целью исследования стало испытание новой методики, основанной на двух методах определения генетической дистанции, используя двухпараметрическую модели Кимуры и модель Тадзимы-Нея.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ / MATERIALS AND METHODS

Исследования осуществляли в Северо-Западной испытательной лаборатории ФГБУ «ВНИИЗЖ» на базе отдела молекулярных исследований, основываясь на используемой внутри организации методической рекомендации по идентификации насекомых и клещей методом ДНК-штрихкодирования (ДНК-баркодинга) (03-2015 МР ВНИИКР) и на методической рекомендации по выявлению и идентификации многоядной мухи-горбатки *Megaselia scalaris* (Loew) (158-2019 МР ВНИИКР). Обе методические рекомендации были разработаны ФГБУ «ВНИИЗЖ». В работе использовались 6 образцов насекомых рода *Megaselia*, поступивших в феромонных ловушках с проб пищевой растительной продукции.

Выделение ДНК проводили методом обработки образца протеиназой К с последующим удалением белков без экстракции органическими растворителями при помощи набора «ДНК-Экстракт 2» («Синтол», Россия). Предварительно

образцы растирали тefлоновыми пестиками, добавляли 300 мкл лизирующего буфера и 1 мкл меркоптанэтанола, и выдерживали в термостате при температуре 56 °C до 2-х суток. После выделения проводили измерение концентрации ДНК при помощи микроспектрофотометра NanoDrop OneC («Thermo Fisher Scientific», США). Концентрация ДНК должна находить в диапазоне от 20 до 60.

Для идентификации насекомых необходимо использовать генетический маркер митохондриального генома – фрагмент гена цитохром-с-оксидаза I (COI)

[3]. Генетические маркеры получали методом классической ПЦР с последующей детекцией с помощью электрофореза. Полученные ампликоны очищались путем связывания ДНК на мембранных колонках в присутствии высококонцентрированных хаотропных веществ, с последующей промывкой и элюцией при помощи набора Cleanup S-Cap («Евроген», Россия). Затем проводилась амплификация «BigDye», с последующей очисткой буфером с магнитными частицами из набора D-Pure («NimaGen», Нидерланды) (таблица 1).

Таблица 1 – Последовательности праймеров и условия амплификации

Праймер		LCO1490	HCO2198
Нуклеотидная последовательность праймера		GGTCAACAAATCATCA TAAAGATATTGG	TAAACTTCAGGGTGAC- CAAAAAATCA
Температурный профиль	Классическая ПЦР	Денатурация при 94°C, продолжительность 10 мин. 5 циклов: денатурация при 94°C, продолжительность 30 сек, отжиг праймеров при 45°C, продолжительность 30 сек, элонгация при 72°C, продолжительность 90 сек. 35 циклов: денатурация при 94°C, продолжительность 30 сек, отжиг праймеров при 51°C, продолжительность 1 мин, элонгация при 72°C, продолжительность 1 мин. Финальная элонгация 72°C, продолжительность 10 мин.	
	«BigDye»	Денатурация при 96°C, продолжительность 1 мин. 25 циклов: денатурация при 94°C, продолжительность 10 сек, отжиг праймеров при 50°C, продолжительность 5 сек, элонгация при 60°C, продолжительность 4 сек. Удержание при 4°C, продолжительность 1 цикл.	

Амплификацию проводили при помощи прибора T100 Thermal Cycler («BIO-RAD», США). Для проведения секвенирования пригодным считался ПЦР-продукт длиной 550–700 п.о..

1 метод. На генетическом анализаторе 3500 Genetic Analyzer («Thermo Fisher Scientific», США) проводили секвенирование. Последовательность генетического маркера получали по прямому и обратному праймерам с помощью программы BioEdit. Идентификация проводилась путем сравнения последовательности исследуемого образца с референсной последовательностью с помощью базы NCBI и с помощью BLAST (Basic Local Alignment Search Tool – средство поиска основного локального выравнивания, семейство компьютерных программ, реализованных на базе NCBI) учитывая 2 критерия: %

покрытия последовательностей (для используемой в работе праймерной системы должен превышать 95%) и % идентичности последовательностей (для праймерной системы LCO1490/HCO2198 >95%).

2 метод. Сравнивая н.п. образца с референсной последовательностью, определяли генетическую дистанцию, используя два способа.

Первый способ основан на двухпараметрической модели Кимуры. Суть метода заключается в разной вероятности замены нуклеотидов путем транзиции (замена пуринового основания на пуриновое, или пиримидинового основания на пиримидиновое) и трансверсии (замена пуринового основания на пиримидиновое и наоборот) [4].

Генетическая дистанция (d_{K_2P}) определяется по формуле:

$$d_{K_2P} = -\frac{1}{2} \ln(1 - 2P - Q) - \frac{1}{4} - \ln(1 - 2Q)$$

Где: P – вероятность транзиции, Q – вероятность трансверзии.

Второй способ определения генетической дистанции методом Тадзимы – Нэя (d) определяется формулами:

$$d = -b \ln\left(1 - \frac{p}{b}\right)$$

$$b = \frac{1}{2} \left(1 - \sum_{i=1}^4 g_i^2 + \frac{p^2}{c}\right)$$

$$c = \sum_{i=1}^3 \sum_{j=i+1}^4 \frac{x_{ij}^2}{2g_i g_j}$$

Где: x_{ij} – относительные частоты н.п., g_i – относительные частоты нуклеотидов, p – отношение количества различий к частотам пар нуклеотидов.

Идентификация считается достоверной, если полученные значения гене-

тических дистанций $<0,07$, т.к. значения генетических дистанций у других видов рода *Megaselia* по сравнению с референсной последовательностью больше 0,07.

РЕЗУЛЬТАТЫ / RESULTS

Проводя исследования по первому методу, были получены данные, представленные в таблице 2.

Из таблицы 2 можно сделать вывод, что при сравнении полученных последовательностей исследуемых образцов с референсной последовательностью при помощи базы NCBI, образец под номером 3 был идентифицирован как *M. spiracularis* (рис. 1), который не относится к карантинным объектам Российской Федерации. Все критерии для используемой праймерной системы были соблюдены.

Проводя исследования по второму методу, были получены данные, представленные в таблице 3.

Идентификация по генетическим дистанциям показала, что все образцы, за исключением образца под номером 3, являются *M. scalaris*, т.к. значения генетических дистанций $<0,07$.

Таблица 2 – Результаты идентификации с помощью базы NCBI

№ образца	% покрытия последовательностей	% идентичности последовательностей	Результаты исследования
1	100,0	99,68	<i>Megaselia scalaris</i> (Loew)
2	96,00	96,25	<i>Megaselia scalaris</i> (Loew)
3	100,00	95,63	<i>Megaselia spiracularis</i>
4	100,00	97,89	<i>Megaselia scalaris</i> (Loew)
5	96,00	97,60	<i>Megaselia scalaris</i> (Loew)
6	100,00	98,92	<i>Megaselia scalaris</i> (Loew)

Таблица 3 – Значения генетических дистанций по двум моделям

№ образца	1	2	3	4	5	6
Двухпараметрическая модель Кимуры (генетическая дистанция)	0,033	0,006	0,139	0,0044	0,084	0,027
Модель Тадзимы-Нэя (генетическая дистанция)	0,031	0,006	0,129	0,0043	0,066	0,026
Идентификация	$<0,07$	$<0,07$	$>0,07$	$<0,07$	$>0,07$; $<0,07$	$<0,07$

National Library of Medicine
National Center for Biotechnology Information

BLAST® » blastn suite » results for RID-JB1M392C013

Check out the ClusteredNR database on BLAST+ [Learn more](#) [Give us feedback](#)

[< Edit Search](#) [Save Search](#) [Search Summary](#) [How to read this report?](#) [BLAST Help Videos](#) [Back to Traditional Results Page](#)

Job Title ...
RID JB1M392C013 [Search expires on 10-12 01:14 am](#) [Download All](#)
Program BLASTN [Citation](#)
Database nt [See details](#)
Query ID lcl|Query_15069
Description None
Molecule type dna
Query Length 556
Other reports [Distance tree of results](#) [MSA viewer](#)

Filter Results
Organism only top 20 will appear ☐ exclude
 Type common name, binomial, taxid or group name
[+ Add organism](#)
Percent Identity to **E value** to **Query Coverage** to
[Filter](#) [Reset](#)

Descriptions [Graphic Summary](#) [Alignments](#) [Taxonomy](#)

Sequences producing significant alignments [Download](#) [Select columns](#) [Show](#) 100 [?](#)

☒ select all 100 sequences selected [GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#) [MSA Viewer](#)

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Megaselia spiracularis mitochondrion complete genome	Megaselia spirac...	870	870	100%	0.0	95.63%	16035	MN832848.1
<input checked="" type="checkbox"/> Phoridae sp. sc. 07745 cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, partial cds: mitochondrial	Phoridae sp. sc...	870	870	100%	0.0	95.63%	658	KX054398.1
<input checked="" type="checkbox"/> Austrochrysa tropica isolate G5-CAU cytochrome c oxidase subunit I (COX1) gene, partial cds: mitochondrial	Austrochrysa tre...	870	870	100%	0.0	95.63%	702	ON839596.1
<input checked="" type="checkbox"/> Megaselia spiracularis isolate CSU19-6 cytochrome c oxidase subunit I (COX1) gene, partial cds: mitochondrial	Megaselia spirac...	870	870	100%	0.0	95.63%	661	QP537516.1
<input checked="" type="checkbox"/> Megaselia spiracularis isolate 53 cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, partial cds: mitochondrial	Megaselia spirac...	870	870	100%	0.0	95.63%	676	JQ941751.1
<input checked="" type="checkbox"/> Megaselia spiracularis isolate sp2 cytochrome c oxidase subunit I (COX1) gene, partial cds: mitochondrial	Megaselia spirac...	870	870	100%	0.0	95.63%	1539	MT396296.1
<input checked="" type="checkbox"/> Megaselia spiracularis isolate sp6 cytochrome c oxidase subunit I (COX1) gene, partial cds: mitochondrial	Megaselia spirac...	859	859	100%	0.0	95.25%	1539	MT396297.1

Рисунок 1 – Результаты идентификации образца 3 с помощью базы NCBI.

ВЫВОДЫ / CONCLUSION

Идентификация двумя методами показала, что первый метод является более точным и информативным, но занимает большее количество времени на исследование, в то время как второй метод имеет погрешность, но требует меньших временных затрат.

Помимо этого, метод идентификации по генетическим дистанциям не позволяет определить образец до вида, если значения выходят за исковые пределы.

Анализируя данные, полученные в ходе использования двух методов можно сделать вывод, что относительно идентификации при помощи базы NCBI, расчет

генетических дистанций с помощью двухпараметрической модели Кимуры имеет большую погрешность, чем использование модели Тадзимы-Нэя, что видно в таблице 3 по образцу под номером 5, который при расчете, используя модель Кимуры, показал результат 0,084, что >0,07 и не позволяет идентифицировать данный объект как *Megaselia scalaris* (Loew), в то время, как расчет при использовании модели Тадзимы-Нэя дал результат 0,066 (<0,07). При идентификации при помощи базы NCBI образец под номером 5 являлся *Megaselia scalaris* (Loew) (рис. 2).

The screenshot displays the NCBI BLAST interface. At the top, the NIH logo and 'National Library of Medicine' are visible. The search results are for query **JB2Y3JK6013**. The 'Filter Results' section shows 'Organism' set to 'only top 20 will appear'. The 'Sequences producing significant alignments' table lists five entries, all identified as *Megaselia scalaris* with 100% identity and 97.60% coverage.

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Megaselia scalaris voucher QCAZI_122139 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds, mitochondrial	<i>Megaselia scalaris</i>	1085	1085	96%	0.0	97.60%	658	MW200983.1
Megaselia scalaris voucher QCAZI_122139 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds, mitochondrial	<i>Megaselia scalaris</i>	1085	1085	96%	0.0	97.60%	658	MW200980.1
Megaselia scalaris voucher QCAZI_122136 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds, mitochondrial	<i>Megaselia scalaris</i>	1085	1085	96%	0.0	97.60%	658	MW200941.1
Megaselia scalaris voucher QCAZI_122133 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds, mitochondrial	<i>Megaselia scalaris</i>	1085	1085	96%	0.0	97.60%	658	MW200722.1
Megaselia scalaris voucher QCAZI_122149 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds, mitochondrial	<i>Megaselia scalaris</i>	1085	1085	96%	0.0	97.60%	658	MW200540.1

Рисунок 2 – Результаты идентификации образца 5 с помощью базы NCBI.

ON THE IDENTIFICATION OF THE MULTI-EATING HUMPBACK FLY MEGASELIA SCALARIS (LOEW)

Zhmurkina P.S.^{1*} – 1st year master's student of the Faculty of Veterinary and Sanitary Examination; **Budovich M.V.**² – Chief Agronomist of the Department of Molecular Research of the SZ-IL; **Karpenko A. A.**¹ – 1st year master's student of the Faculty of Veterinary and Sanitary Examination; **Kalyuzhnaya T.V.**¹ – PhD of veterinary science, Associate Professor, (ORCID 0000-0002-8682-1840); **Orlova D.A.**¹ – PhD of veterinary science, Associate Professor, (ORCID 0000-0002-8163-8780).

¹ Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «SPbSUV»

² North-West Branch of Federal State-Financed Institution «Federal Centre for Animal Health»

*pannyteam@yandex.ru

ABSTRACT

Ant-decapitating flies (lat. *Megaselia scalaris* (Loew)) is a quarantine object in the Russian Federation and is included in the Single list of quarantine objects of the Eurasian Economic Union, approved by the of the Council of the Eurasian Economic Commission dated 30.11.2016 No. 158, because it is a vector of dangerous diseases that cause great economic damage. The range covers large areas of North America, Africa, southern Europe, Australia, Southeast Asia, as well as the European part of Russia, namely the Southern Federal District and the Republic of Crimea. The list of regulated products subject to research to identify *M. scalaris* (Loew) is very extensive, and accurate identification to species of the received samples by entomological method by morphological features of copulatory organs is very labor-intensive and not accurate. Therefore, methods of molecular diagnostics were developed for identification, namely, comparison of the studied nucleotide sequence with the refer-

ence one using NCBI database and determination of genetic distances. The studies were carried out on the basis of the Department of Molecular Research of the North-West Testing Laboratory of FGBU «ARRIAH». Six samples of the genus *Megaselia* were used in this work. At the first stage, DNA was isolated using DNA-Extran 2 kits. Then genetic markers were obtained by classical PCR with subsequent detection by electrophoresis using the T100 Thermal Cycler, sequenced on a 3500 Genetic Analyzer. Identification was performed by comparing the obtained sequence in BioEdit program using NCBI database and by calculating genetic distances using two-parameter Kimura model and Tajima-Nei model. The study revealed advantages and disadvantages of the presented methods of molecular identification.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Boehme P., Amendt J., Disney R.H.L., Zehner R. 2010. Molecular identifications of carrion-breeding scuttle flies (Diptera: Phoridae) using COI barcodes. *International Journal of Legal Medicine*, 124: 577-581.
2. Borgmeir T.A. 1968. A Catalogue of the Phoridae of the World (Diptera, Phoridae). *Studia Entomologica*, 11: 1-367;
3. Cover F. 1991. *Insect and Mite Pests in Food: An Illustrated Key*. Vol 1. U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service: 767.
4. Kimura M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of molecular evolution*. Vol. 16. № 2. P. 11–120.
5. Кузнецов, В. М. Методы Нея для анализа генетических различий между популяциями / В. М. Кузнецов // Проблемы биологии продуктивных животных. – 2020. – № 1. – С. 91-110.

REFERENCES

1. Cover F. 1991. *Insect and Mite Pests in Food: An Illustrated Key*. Vol 1. U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service: 767.
2. Borgmeir T.A. 1968. A Catalogue of the Phoridae of the World (Diptera, Phoridae). *Studia Entomologica*, 11: 1-367;
3. Boehme P., Amendt J., Disney R.H.L., Zehner R. 2010. Molecular identifications of carrion-breeding scuttle flies (Diptera: Phoridae) using COI barcodes. *International Journal of Legal Medicine*, 124: 577-581.
4. Kimura M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of molecular evolution*. Vol. 16. № 2. P. 11–120.
5. Kuznetsov, V. M. Ney's methods for analyzing genetic differences between populations [Проблемы биологии продуктивных животных]. 2020.;1:91-110. [in Russ.]