



Молекулярная генетика для оперативной видовой диагностики лесных насекомых и для изучения процессов их инвазий

Наталья КИРИЧЕНКО

к.б.н., с.н.с. ИЛ СО РАН



Французский национальный институт с/х исследований
INRA, Орлеан, Франция

Содержание



(1) Насекомые: биоразнообразие, инвазии, воздействие на среду.

(2) Насекомые, минирующие листья древесных растений.

(3) ДНК-баркодинг: современный метод молекулярной идентификации и изучения биоразнообразия насекомых.

(4) Генетическая библиотека минирующих насекомых Сибири. Ревизия местной фауны и открытие новых видов.

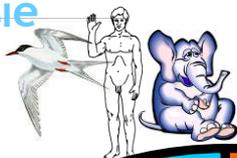


(1) Насекомые: биоразнообразие, инвазии, воздействие на окружающую среду

Таксономическое разнообразие насекомых

> 60% всех организмов на планете

Позвоночные



Беспозвоночные

Многоножки,
скорпионы,
пауки и т.д.



Беспозвоночные

НАСЕКОМЫЕ

Число видов:

~1 млн. изученных

~ 2.5 - 10 млн. еще не описано



Инвазии насекомых: благоприятствующие факторы



Деятельность человека



Рост международной торговли



Рост туризма

Интродукция,
обоснование и
акклиматизация
насекомых

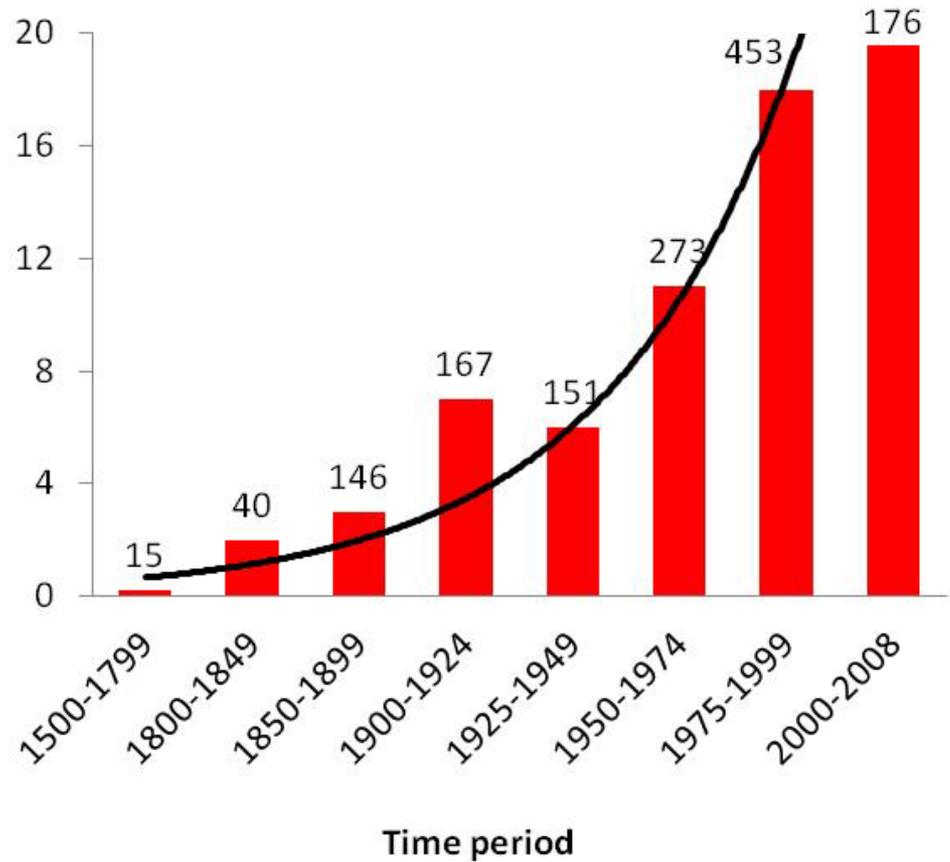


Изменение климата

Инвазии насекомых в Европе: экспоненциальный рост



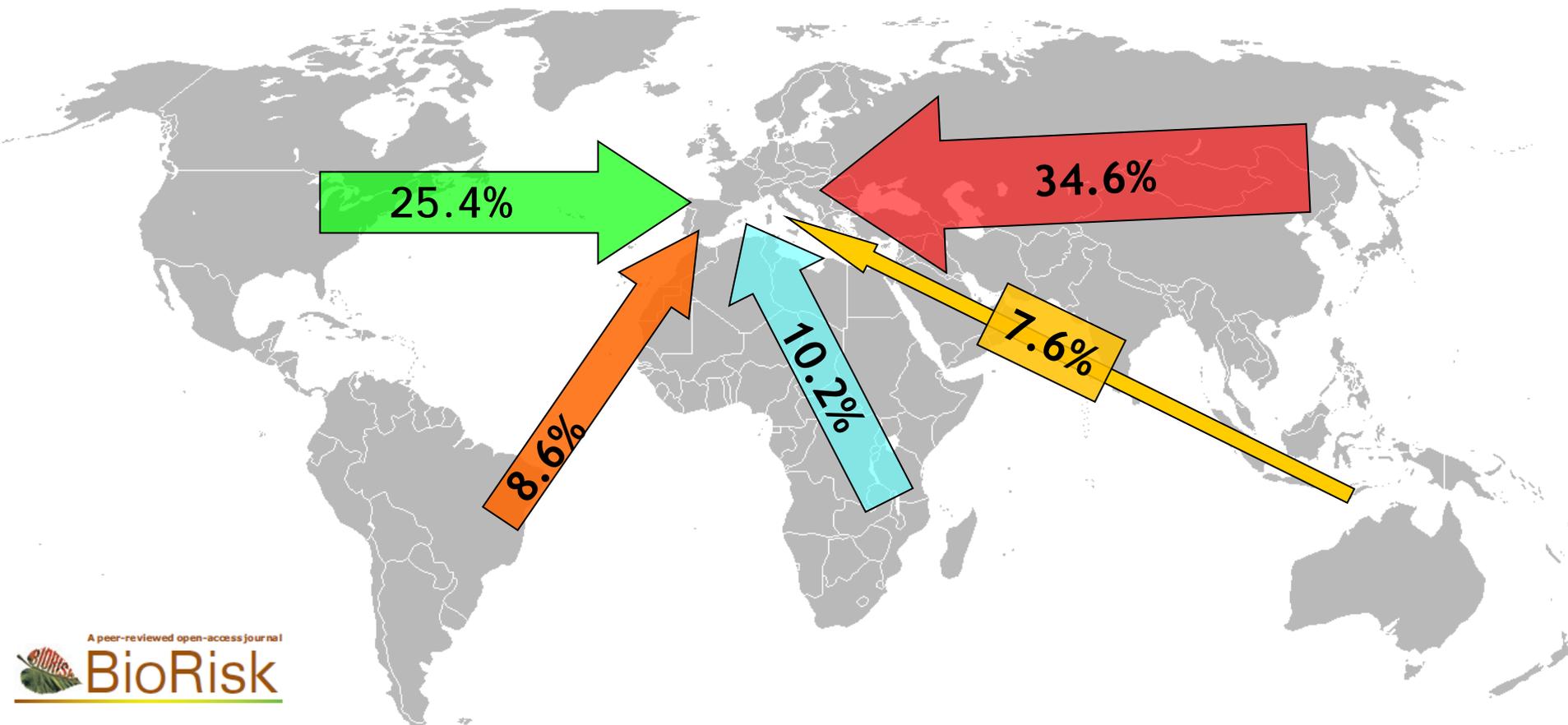
Число инвазивных видов насекомых, отмеченных за год на протяжении указанных периодов



(источник: Roques et al., 2010)

Инвазийные насекомые в Европе: регионы происхождения

Asia is one of the main providers of insect pests for Europe





(2) Насекомые, минирующие листья древесных растений

Инвазийные минирующие насекомые



Каштановая минирующая моль

Cameraria ohridella Deschka & Dimic, 1986

Происхождение: Балканский п-ов

Инвазия: Европа, Европ. ч. России

Кормовые растения: конский каштан
Aesculus hippocastanum

Значение: массовый вредитель в искусственных экосистемах



Виноградная минирующая моль

Antispila oinophylla Van Nieuwerkerken & Wagner, 2012

Происхождение: США

Инвазия: Италия

Кормовые растения: виноград *Vitis* spp.

Значение: массовый с/х вредитель

Инвазийные минирующие насекомые



Цитрусовая минирующая моль

Phyllocnistis citrella Stainton, 1856

Происхождение: Азия (Япония, Индия, Тайвань и т.д.)

Инвазия: всемирно, где выращивают цитрусовые

Кормовые растения: цитрус *Citrus* spp.

Значение: массовый с/х вредитель



Липовая минирующая моль

Phyllonorycter issikii (Kumata, 1963)

Происхождение: Вост. Азия (Япония, Корея, РДВ)

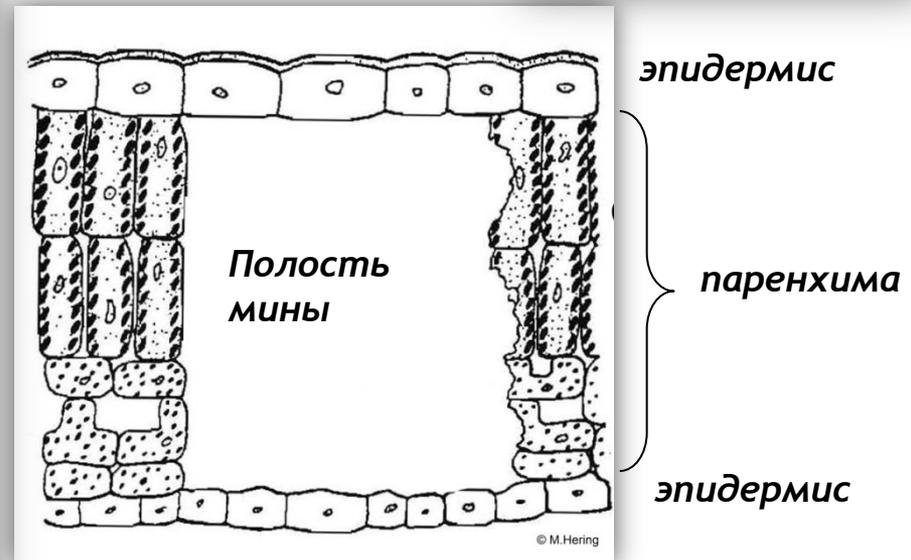
Invasion: Европа, Европ. ч. России, Сибирь

Кормовые растения: липа *Tilia* spp.

Значение: массовый вредитель в искусственных и природных экосистемах

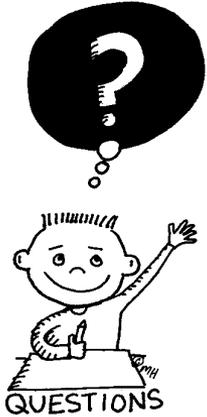
Минирующие насекомые

- скрытоживущий образ жизни - живут в тканях листьев в полостях – **минах** (легко обнаруживаются)



Мина в поперечном разрезе

Минирующие насекомые



Какой интерес?

- не приводят древесные растения к гибели; массовые повреждения в искусственных и природных экосистемах, с/х вредители
- инвазии
- удобный объект для разных экологических задач:



- (1) изучение разных аспектов взаимоотношений в системе насекомое-растение
- (2) изучение механизмов биологических инвазий

Минирующие насекомые

Богатое таксономическое разнообразие на древесных растениях



Моли Lepidoptera (37 семейств; > 170 родов)



Мухи Diptera (9 семейств; > 40 родов)



Жуки Coleoptera (5 семейств; > 30 родов)



Пилильщики Hymenoptera (2 семейств; > 15 родов)

- в Европе: 2500 видов минеров
- в Европе: повреждают > 1500 видов древесных и травянистых растений
- **плохо изученная группа насекомых в Сибири !**

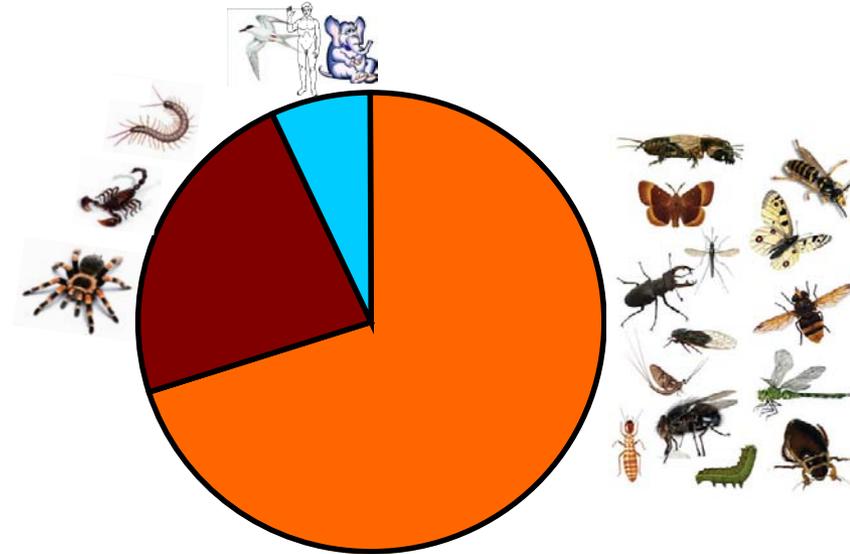


Важность точной диагностики видов насекомых

Идентификация видов насекомых (инвайдеров) – непростая задача

Причины:

- **высокое** таксономическое разнообразие насекомых;
- **дефицит** специалистов;
- **необходимость** имаго насекомых для точной морфологической диагностики;
- **проблематичность** или **невозможность** диагностирования насекомых по их личинкам и куколкам.



(**ВАЖНО:** чаще всего именно личинки и куколки обнаруживаются при карантинном досмотре на границе или в регионах, куда насекомое уже успело проникнуть и обосноваться).

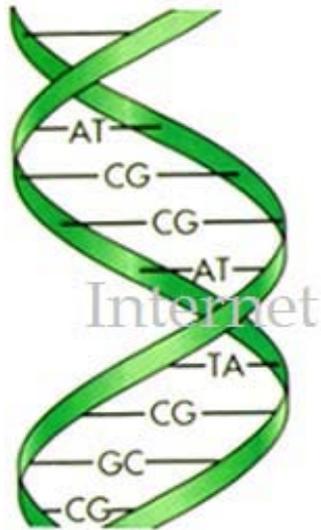
Важность точной диагностики видов насекомых

Быстрая и точная идентификация насекомых-вредителей – первоочередная задача, от решения которой зависит эффективность защиты растений и реализации соответствующих карантинных программ.



**(3) ДНК-баркодинг: современный метод
молекулярной идентификации и изучения
биоразнообразия насекомых**

DNA



ДНК (дезоксирибонуклеиновая кислота) -

макромолекула, которая кодирует генетическую информацию, обеспечивающую хранению и передачу генетической программы развития и функционирования живых организмов.

Нуклеотид - структурная единица ДНК, в состав которого входят

- фосфорная к-та и сахар (дезоксирибоза)
- 4 азотистых основания: аденин (А), тимин (Т), гуанин (G) и цитозин (С)

ДНК-баркодинг: ID для **всех** организмов Земли



В 2003 г, канадский ученый П. Хеберт (**P. Hebert**) опубликовал научную статью :
о **новом методе каталогизации биоразнообразия на основе использования короткого стандартного фрагмента ДНК для идентификации организмов.**



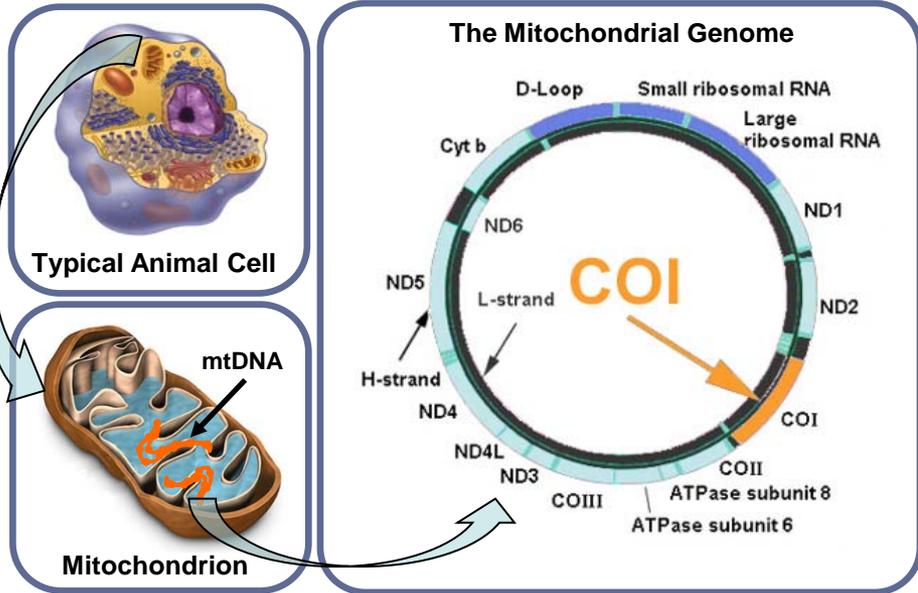
Метод назван **ДНК-баркодингом (или ДНК-штрихкодирование).**

Аналог: универсальный штрихкод товаров в супермаркете.

ДНК-баркодинг

Короткий стандартный фрагмент ДНК (*ДНК-маркер*) для идентификации организмов

An Internal ID System



© Internet credit

ДНК маркер для животных

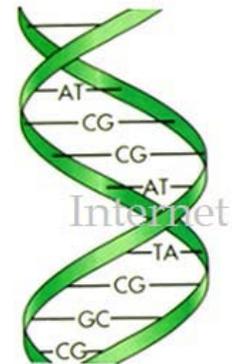
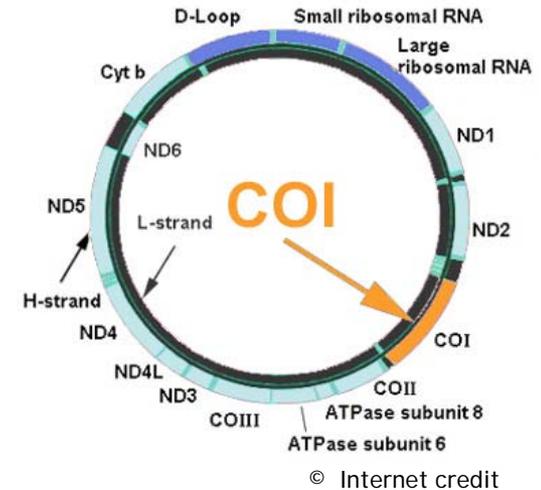
5'-фрагмент первой субъединицы митохондриального гена, кодирующего белок цитохром-С-оксидазу COI

- mutation rate is often fast enough to distinguish closely related species.

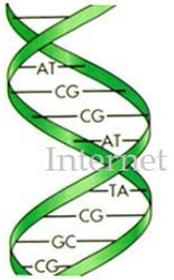
ДНК-баркодинг

Основные требования к ДНК-маркеру :

- 1) **небольшой** размер, mitDNA COI - 658 bp;
- 2) последовательность нуклеотидов в ДНК должна быть **одинаковой (близкой)** у особей **одного вида** и **достоверно различаться** у особей **разных** видов;
- 3) **количество полиморфных нуклеотидов** в последовательности для особей одного вида **не должно превышать порог** (обычно ~1%);
- 4) во избежание ошибок **последовательность нуклеотидов читают в обоих направлениях** (с обеих цепочек ДНК).



ДНК-баркодинг: плюсы и минусы



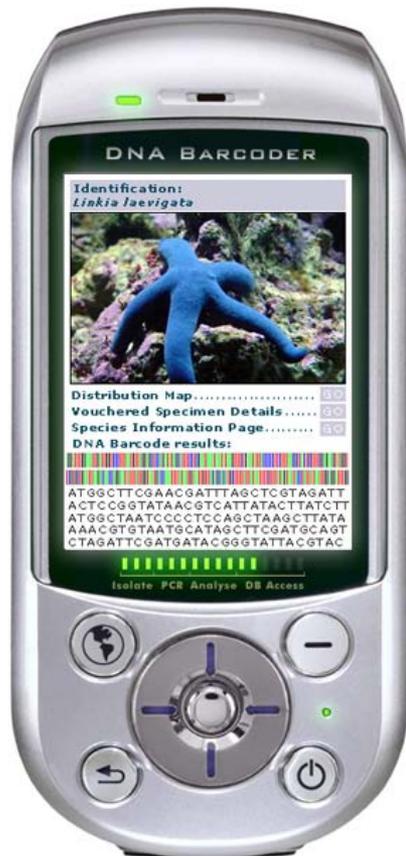
- полуавтоматический режим
- доступен в использовании
- высокая разрешающая способность
- применим к любой жизненной стадии организма



- все еще дорогое удовольствие...
- гибридизация
- псевдогены
- патологические мутации
- продолжающиеся процессы видообразования

ДНК-баркодинг: ID для **всех** организмов Земли

- в 2004 г. был основан международный консорциум «Штрихкод жизни» («Consortium for the Barcode of Life, CBOL»)
- в 2005 г. к этому проекту присоединилась Россия



Мечта участников проекта «Штрихкод жизни»
- миниатюрный ДНК-штрихкодер.

Существует пока только в воображении.

Рисунок с сайта <http://www.barcodeoflife.org>

BOLD: Barcode Of Life Data systems

2.5 Million barcodes; **190,000** species

www.boldsystems.org

- A sequence database specifically devoted to DNA barcoding.
- Online platform for analyzing DNA sequences.



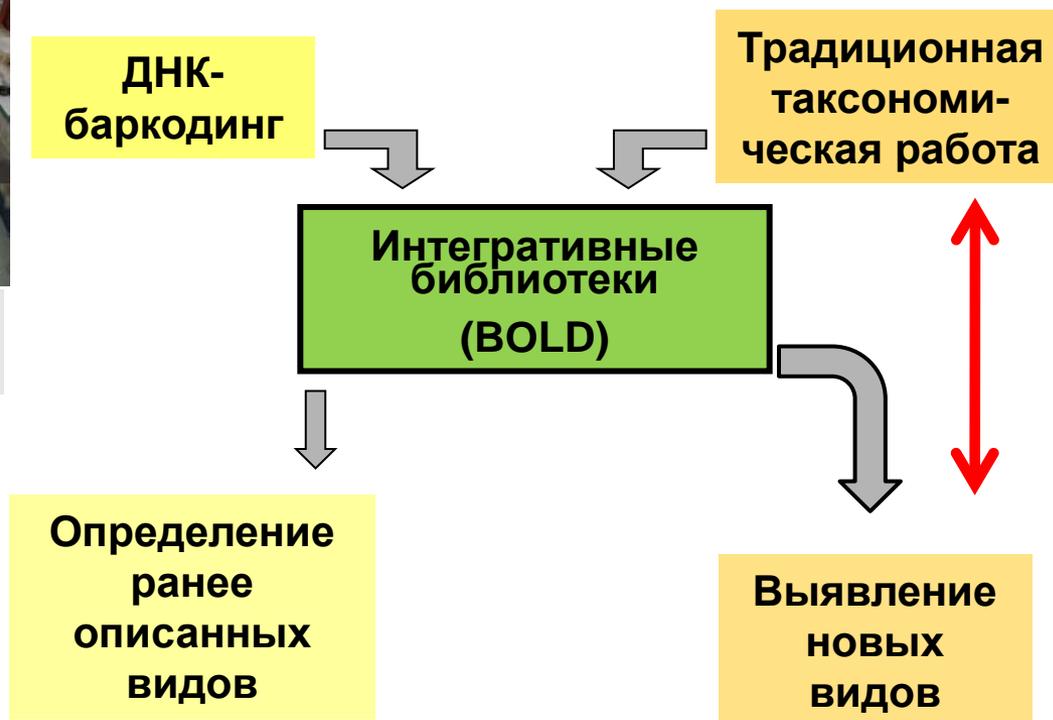
Новая интегративная таксономия

Сочетает различные признаки организма:

- морфологические
- экологические
- молекулярно-генетические



ДНК
экстракция



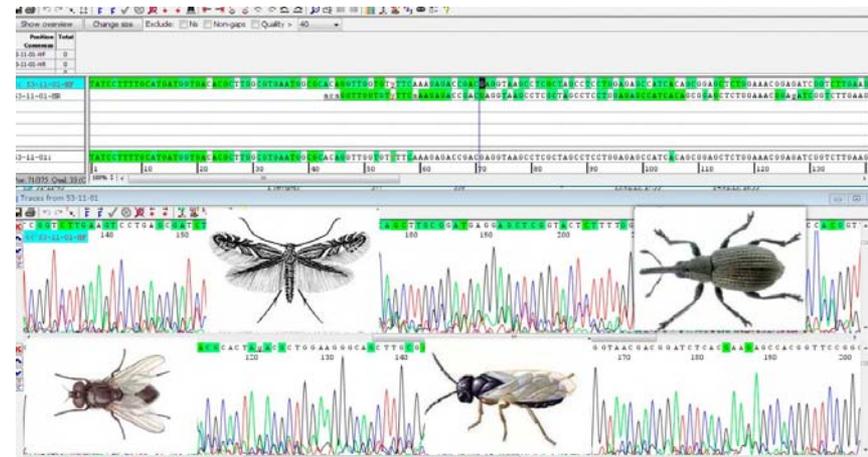


(4) Генетическая библиотека минирующих насекомых Сибири

Библиотеки ДНК-штрихкодов

Преимущества

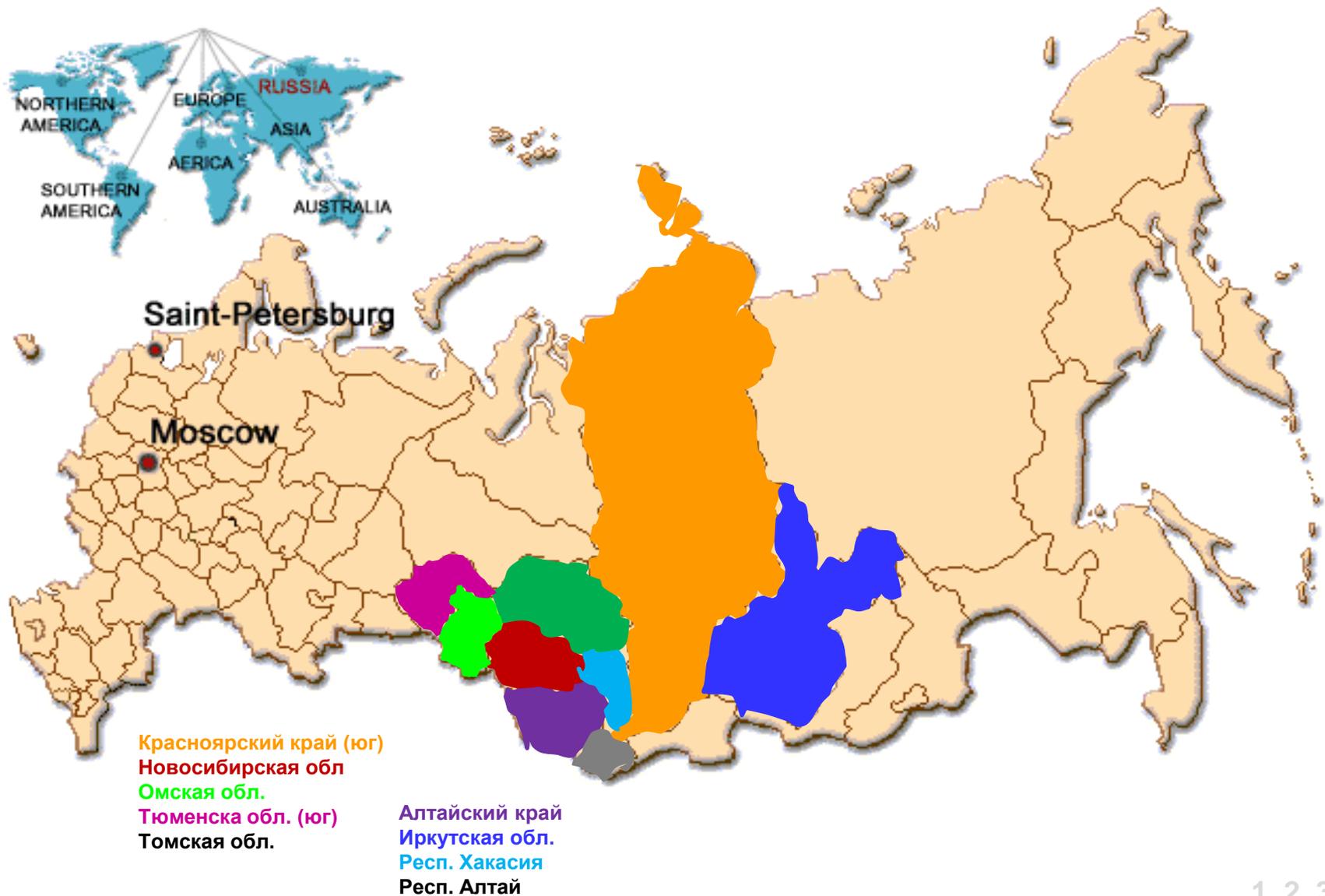
- значительно облегчают ревизию организмов
- способствуют выявлению инвазийных видов
- позволяют открывать новые для науки виды



НО...

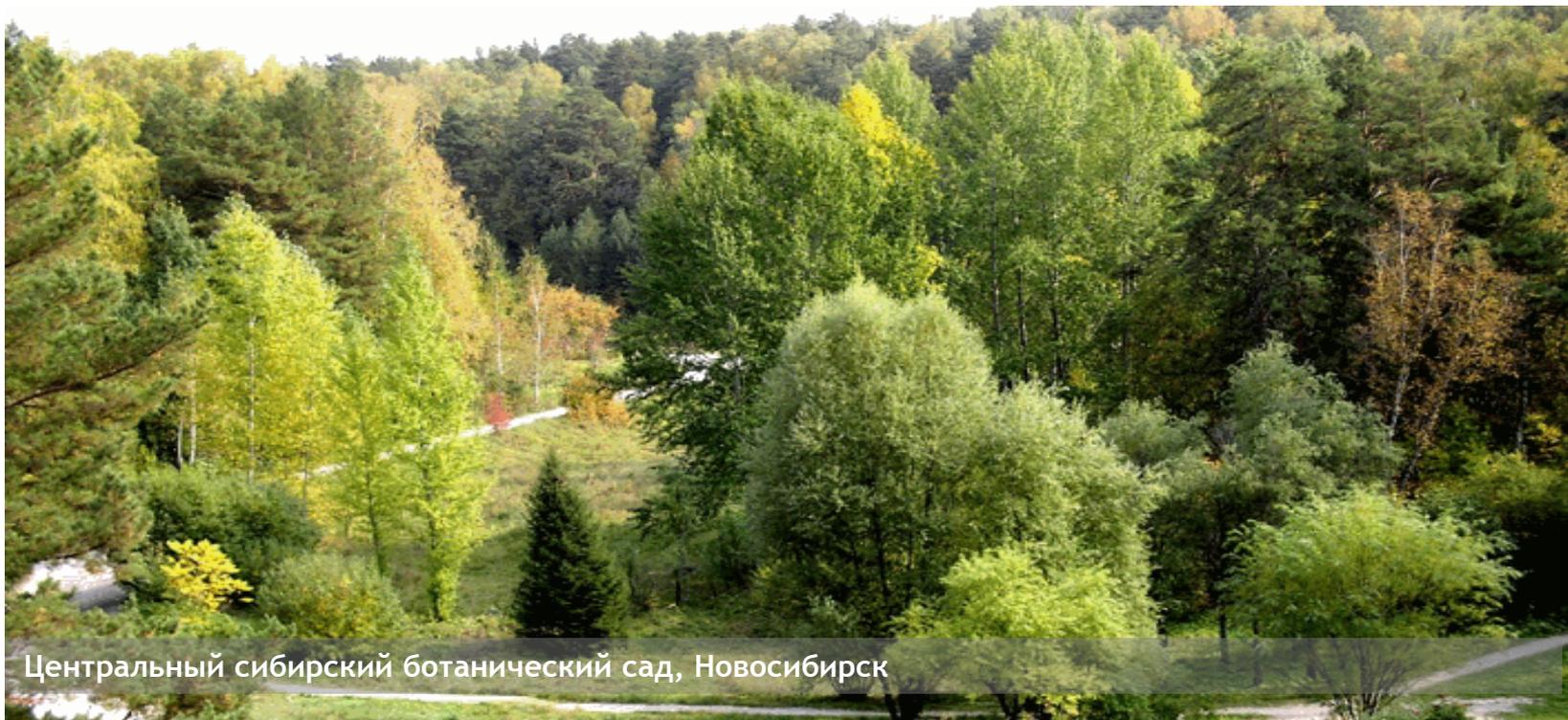
- не заменяют традиционный морфологический подход для определения организмов
- ДНК-баркодинг и традиционная таксономия - два инструмента, дополняющие друг друга и должны использоваться совместно

СИБИРЬ: сборы минеров (2005-2014)



Полигоны исследований: дендрарии и ботсады

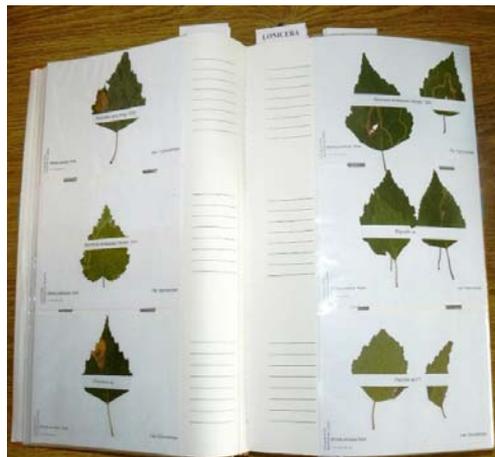
- Значительное число видов древесных растений из разных ботанико-флористических регионов;
- Интродуцированные и близкородственные местные растения в соседстве
 - занос новых вредителей
 - аккумуляция местной флоры на интродуцированных растениях



Центральный сибирский ботанический сад, Новосибирск

Сборы минеров в Сибири

Аннотированный гербарный материал:
позволяет установить связи насекомых
с их кормовыми растениями в Сибири



- 9 томов: 7000 образцов листьев с минами и насекомыми
- > 90 древесных растений (местных и интродуцентов)

Консервация личинок, куколок и
взрослых насекомых в 96% для
молекулярно-генетических
анализов



Вэб-ресурс: минирующие насекомые Сибири

<http://leafminerssiberia.ru/>

Home News Intro Plants Miners Literature Contacts Site-map



Исследования выполнены в рамках проекта «Оценка инвазивного потенциала дендрофильной энтомофауны в Сибири», поддержанного грантом Президента РФ (МК-7049 2010 4).

Дополнительная поддержка:
Программа Евросоюза FP7 (проект PRATIQUE)
Грант Сибирского Отделения РАН (Лаврентьевский конкурс)

Дорогой посетитель!

Приветствуем Вас на главной странице сайта по минирующим насекомым на древесных растениях в Сибири!

В Сибири эта группа насекомых недостаточно изучена, несмотря на то, что минирующие насекомые (минеры) повреждают широкий спектр видов древесных растений и легко обнаруживаются по оставленным на листьях повреждениям (минам).

В основу создания сайта легли наши исследования, проводившиеся в дендрариях, ботанических садах, парках и пригородных лесах в Красноярском крае, Новосибирской, Томской и Иркутской области, а так же сведения из литературы. В энциклопедии приведены описания повреждений (мин), морфологические и фенологические характеристики минеров, указаны виды кормовых растений в местах распространения минеров, сведения о ареале и вредности насекомых. В большинстве случаев описания иллюстрированы оригинальным фотоматериалом. Подобных электронных ресурсов в России для минирующих насекомых ранее не существовало.

Прежде чем начать пользоваться ресурсом, предлагаем прочесть раздел «Введение». Здесь приведены основные сведения о минирующих насекомых и примеры характерных повреждений, нанесенных представителями разных отрядов. Внутри раздела «Растения» представлен список родов растений. Для каждого рода растения в алфавитном порядке приведен иллюстрированный список минирующих насекомых со ссылками на статьи по каждому представителю. Зная род растения, на котором обнаружена мина насекомого, по иллюстрациям и описаниям Вы сможете найти до искомого таксона минера. Если Вам известен таксон минера, Вы можете получить информацию о нем в разделе «Минеры», минуя раздел «Растения». Здесь в алфавитном порядке приведен полный список латинских названий насекомых со ссылками на соответствующие описания.

Многие насекомые, для которых приведены видовые названия, – обычные в Сибири. Их определение в елов по совокупности признаков: морфологии мин, личинок, куколок, и лишь в некоторых случаях – по взрослым насекомым. Ряд видов насекомых из наших сборов, особенно те, для которых мы не обнаружили литературных сведений об их распространении в Сибири, требуют таксономического подтверждения. Для них указаны только родовые названия, в качестве информации приведено описание близкородственных видов, обитающих в Европе.

Мы продолжаем работу над сайтом. Будем рады получить Ваши комментарии и советы.

Сайт рекомендована для широкого круга пользователей: исследователей, преподавателей, студентов и всех, кто интересуется энтомологией. Надеемся, что она окажется полезной для решения научных и образовательных задач.

Создатель сайта

Copyright © 2011-2012. Электронная энциклопедия «Минирующие насекомые на местных и интродуцированных древесных растениях в Сибири»
Кириничко Наталья Ивановна, Институт леса им. В.Н. Сукачева СО РАН, Академгородок 50/28, Красноярск.

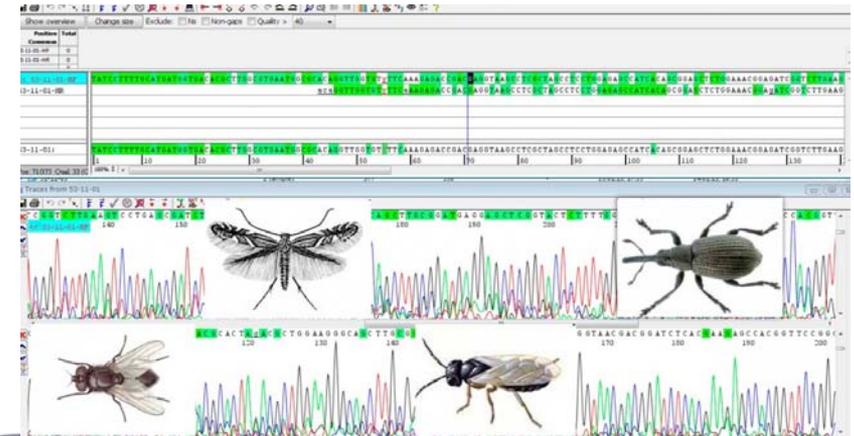
Copyright © 2011, 2012. Хостинг: СТРОЙ ВЕБ «ТЭТЭИ» 002893

- **176** видов и морфо-видов минеров (многие требовали таксономического подтверждения)

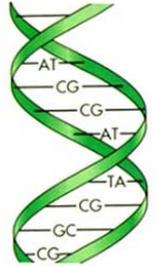
- **35** родов и **90** видов древесных растений, повреждаемых минерами в Сибири

FIRST electronic resource on leaf mining insects in Russia.

Минеры Сибири: создание библиотеки ДНК-штрихкодов



Минеры Сибири: создание библиотеки ДНК-штрихкодов



На сегодня ДНК-штрихкодировано > 400 образцов ,
идентифицировано 54 вида и морфовида минирующих насекомых

The screenshot shows the BOLD Systems project console for the project 'Leafminers from northern Asia [SIBLE]'. The interface includes a navigation bar with 'BOLDSYSTEMS' and links for Databases, Taxonomy, Identification, Workbench, and Resources. The main content area is divided into several sections:

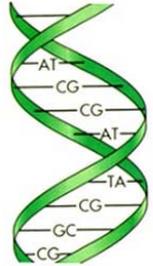
- Project Search:** A search bar with filters for Code, Tag, and Title, and a 'Records: Search' button.
- PROJECT DATA VIEWS:** Buttons for 'View All Records' and 'User Console'.
- PROJECT OPTIONS:** Links for 'List All Projects', 'Register Primers', and 'View All Primers'.
- PUBLICATION:** Links for 'Bibliography Submission', 'Project Summary - Specimens, Localities, and GenBank', and 'UPLOADS' (Specimen Data, Specimen Images, Sequences, Trace Files).
- DOWNLOADS:** Links for 'Sequences', 'Data Spreadsheets', 'Specimen Labels', and 'Trace Files'.
- SEQUENCE ANALYSIS:** A section at the bottom left.
- Progress:** A table showing specimen and species completion rates.

	Specimens (% complete)	Species (% complete)
COI-5P	30 / 35 (85.7%)	20 / 25 (80%)
- Data Summary:** A section showing 'BINs: 25', 'Countries: Russia(35)', and a 'Taxonomy Breakdown' pie chart.

Order	Count	Percentage
Coleoptera (order)	11	31.4%
Hymenoptera (order)	11	31.4%
Diptera (order)	9	25.7%
Lepidoptera (order)	4	11.4%
- Project Details:** A section with fields for Title, Code, Description, Campaign, Marker(s), and Bounding Box Coordinates.
- Most Recent Activities:** A table showing recent actions with columns for Timestamp, Who, and Action.

Timestamp	Who	Action
Feb-24, 2015 15:00	BOLD Data Manager	Filtered-Update (1)
Feb-17, 2015 14:37	Carlos Lopez-Vaamonde	Move-Records (1)
Jan-21, 2015 12:30	Carlos Lopez-Vaamonde	Move-Records (1)
Aug-27, 2014 09:32	Carlos Lopez-Vaamonde	Move-Records (35)
Aug-27, 2014 09:28	Carlos Lopez-Vaamonde	New-Project

Минеры Сибири: создание библиотеки ДНК-штрихкодов



BOLDSYSTEMS

Specimen - Leafminers from northern Asia [SIBLE] Print

[Edit Specimen](#)

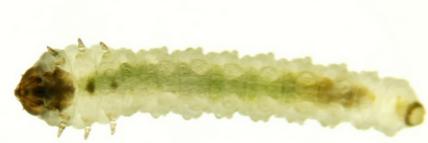
IDENTIFIERS

Sample ID: NK243
Process ID: ISSK107-14
Institution Storing: Institut National de la Recherche Agronomique, Zoologie Forestiere
Field ID: Kr-42-11
Museum ID:
Collection Code:

TAXONOMY

Identification: *Metalus albipes*
Rank: Species
Identifier: [Natalia Kirichenko](#)
Identification Method:
Identifier Institution: Sukachev Institute of Forest Siberian Branch of Russian Academy of Sciences
Identifier Email: nkirichenko@yahoo.com
Taxonomy Note:
Rank: Current Record (NK243) Others in BIN (BOLD:AAZ6157)
Phylum: [Arthropoda](#) [4]
Class: [Insecta](#)
Order: [Hymenoptera](#)
Family: [Tenthredinidae](#) [4]
Subfamily: [Heterarthrinae](#) [4]
Genus: [Metalus](#)
Species: [Metalus albipes](#) Metalus capitals [4]

PHOTOGRAPHS



License: Copyright (2014)
License Holder: Natalia Kirichenko, Sukachev Institute of Forest
[Add Tags & Comments](#) Comments: 0 [Assoc](#)

Dorsal **Upper side** **Ventral**



GEOGRAPHY

Country: Russia
Province/State:
Region/County: Krasnoyarskiy kray

BOLDSYSTEMS

Sequence - Leafminers from northern Asia [SIBLE] Print

IDENTIFIERS

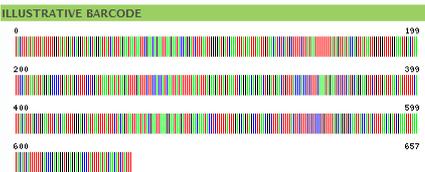
Sample ID: NK243
Process ID: ISSK107-14
Identification: *Metalus albipes*
BIN: [BOLD:AAZ6157](#)

COI-SP

SEQUENCE DATA

Genbank Accession:
Translation Matrix: Invertebrate Mitochondrial
Last Updated: 2014-05-26
[Clear Sequence](#) [Edit Sequence](#)

ILLUSTRATIVE BARCODE



NUCLEOTIDE SEQUENCE

Sequence: 658 bp

```
TACITTTATATTTTATTTTGGTATATGATCAGGTACTAGGATTACITTAGAATAAT  
AATTGGAACAGAAATAAGAAATACCAGGATCTTTAATGGGGATGATCAAATTTATAATTT  
AATTGTAACATCTCATGCTTTTCTTATAATTTTTTTATAGTATACCAAGTATAATTTGG  
TGGTTTTGGAAATTTGACTAATTCGATATATATAGGACCCCGGATATAGCTTTCTCTGG  
ATTAATAATATAAGATTTTGATTTCTCCACCATCAATTAATTTTTAATTTAGAGAG  
ATTAGTAATTCAGGAACAGGAAGCTGGATGACGTTTACCACCTCTTTCGAATAGAAAT  
CTCTGACCGGGAAATCTGTTGATTTACACTTTTTTTTCATTTAGCTTTAGCTGGAAATC  
ATCAATTTGGGAGCTTAATTTTATTTCTACAGTAATTAATATACGAATTAAGGAAT  
AAGATTTGAACAAATACCTCTTTTATTTGACGATACCCCTTACAGGCTTTACTTTTACT  
TCTTTCTGCTCCCTTTTACGAGGTGCAATTTACCAATTTTTTACAGATAGAAATTAAT  
TACATCATTTTTTGACCCGAGAGGTGGAGGAGACCTATTTTATATCAACATCTATTT
```

SEQUENCING RUNS: Biodiversity Institute of Ontario

Run Date	Direction	Trace File	Seq Primer	Quality
2014-05-22	Reverse	ISSK107-14(C_LepFolF_C_LepFolR)_L.ab1	C_LepFolF	high
2014-05-22	Forward	ISSK107-14(C_LepFolF_C_LepFolR)_F.ab1	C_LepFolF	high

[Sequence Editor](#) [View Trace Files](#) [Download](#)

ANNOTATION

Composition: A (207), G (91), C (95), T (265)
Ambiguous Characters: 0
Identify Sequence Using:

Генетика + морфология & экология

Библиотеки ДНК-штрихкодов

The screenshot shows the BOLD Systems Project Console for the project 'Leafminers from northern Asia'. The interface includes a search bar, navigation tabs (Databases, Taxonomy, Identification, Workbench, Resources), and a 'Project Search' section. The main content area is divided into several panels:

- Program:** Shows specimen and species completion rates for COI-SP (30/35, 85.7% and 20/25, 80% respectively).
- Data Summary:** Includes a pie chart showing the taxonomic breakdown: Coleoptera (31.4%), Hymenoptera (31.4%), Diptera (25.7%), and Lepidoptera (11.4%).
- Project Details:** Lists the title, code (SIBLE), description, campaign (General Projects), marker (COI-SP), and bounding box coordinates.
- Most Recent Activities:** A table listing recent updates, including timestamps, user names (BOLD Data Manager, Carlos Lopez-Vaamonde), and actions (DF Merge-Update, Move-Records, New-Project).

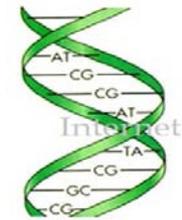
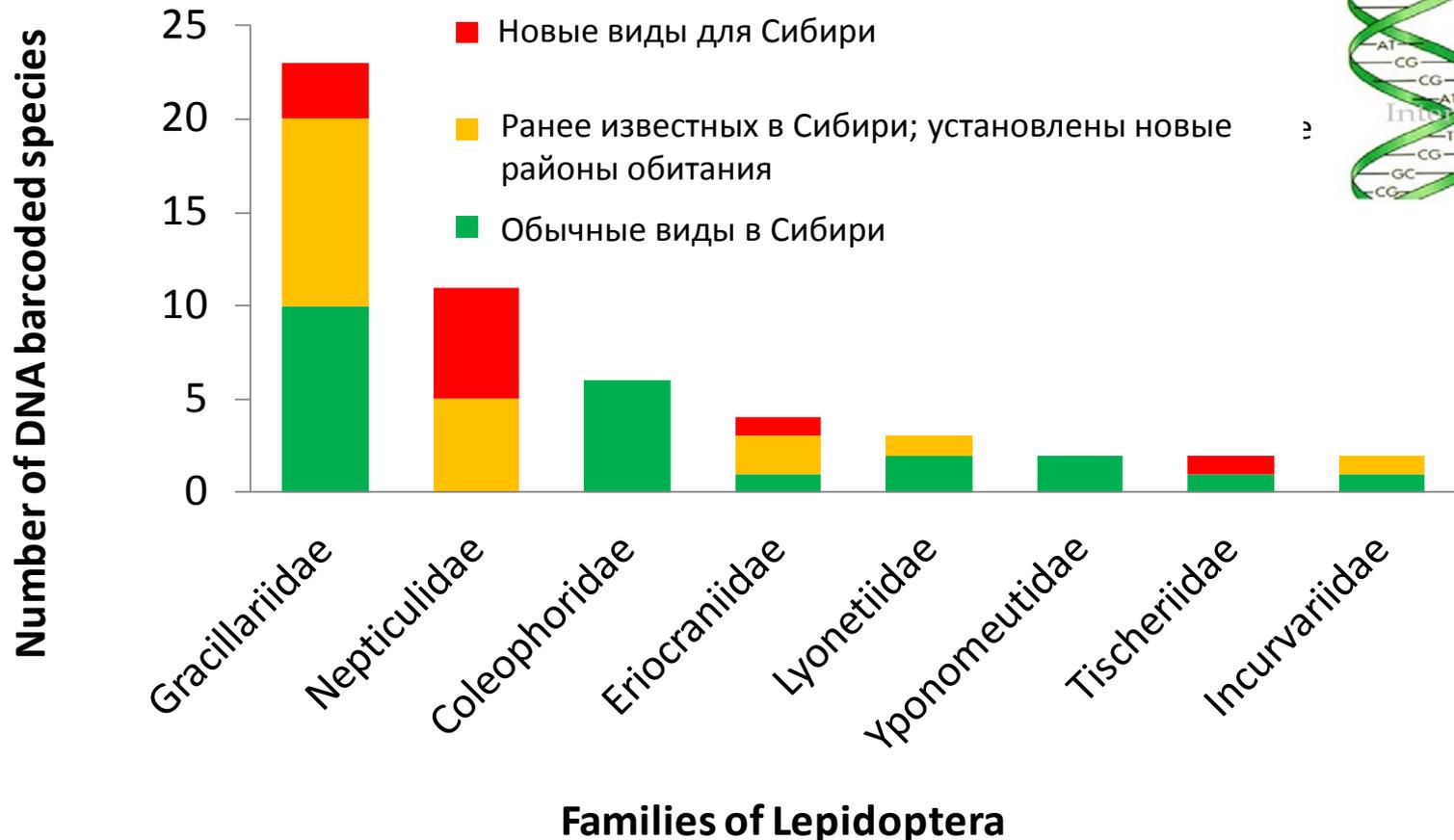
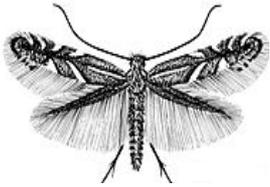
Вэб-ресурс: минирующие насекомые Сибири

The screenshot shows the website 'Минирующие насекомые Сибири' (Mining Insects of Siberia). The website features a navigation menu with links to 'ГЛАВНАЯ', 'НОВОСТИ', 'ВВЕДЕНИЕ', 'РАСТЕНИЯ', 'МИНЕРЫ', 'ЛИТЕРАТУРА', 'КОНТАКТЫ', and 'КАРТА САЙТА'. The main content area includes a header with the title and a search bar, followed by a large image of a leaf with a mine. Below the image, there is text describing the project, including the title 'Исследования выполнены в рамках проекта «Оценка инвазивного потенциала бентобиоты автомобильной в Сибири», поддержанного грантом Президента РФ №К-7049.2010-4)'. The website also features a section for 'Минирующие насекомые Сибири' with a list of species and a search bar. The footer contains copyright information for 2011-2012, mentioning the 'Электронная энциклопедия «Минирующие насекомые на местных и интродуцированных древесных растениях в Сибири»' and the authors: Кириченко Наталья Ивановна, Институт леса им. В.Н. Сукачева СО РАН, Академгородок 50/28, Красноярск.

Подобная интеграция поспособствует:

- быстрой и надежной диагностике;
- отслеживанию инвазивных видов.

Discovery of new species: first records in Siberia



Discovery of **new** species to science

A **new micromoth** species attacking Siberian peashrub *Caragana arborescens* in Siberia.



Micrurapteryx gradatella Herrich-Schäffer, 1855

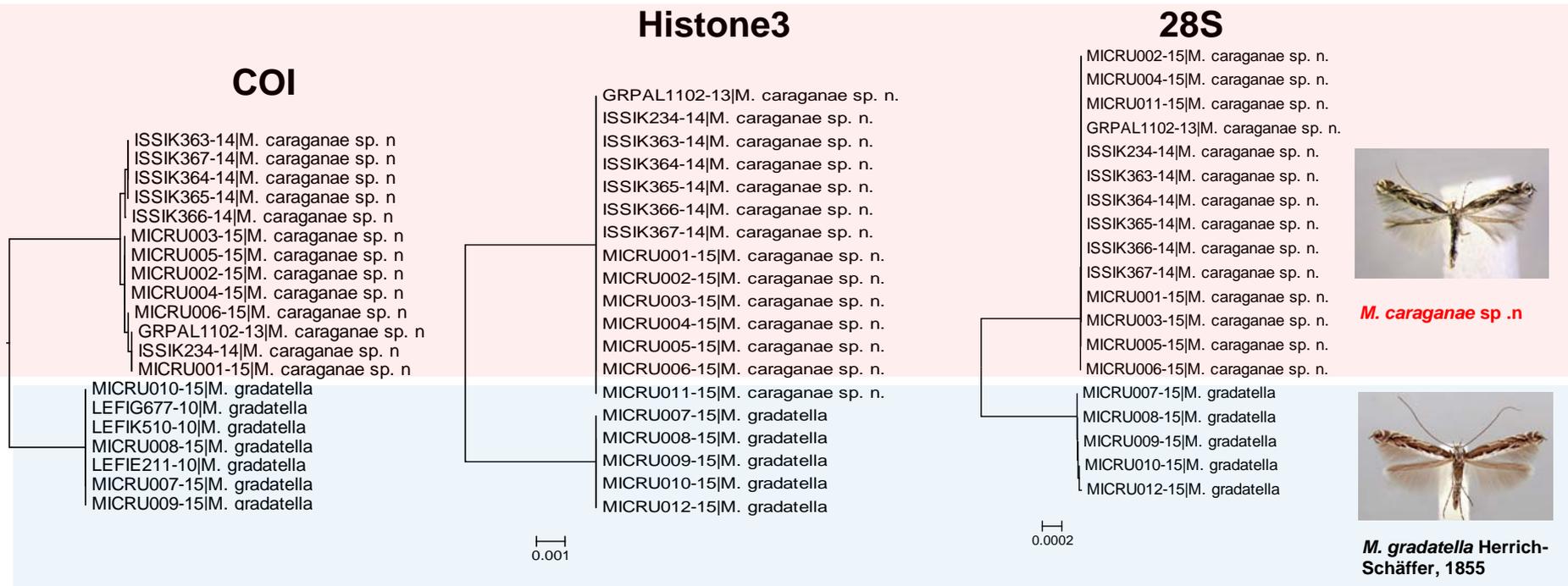


Micrurapteryx sp. n.



© NK

Discovery of **new** species to science



№ of mutations: **56**
 % interspecific distance: **9,75**

3
0,92

2
0,20

Zookeys, 2015: Systematics and biology of *Micrurapteryx* (Lep., Gracillariidae) with description of a new species

ВЫВОДЫ

- **Кампания по ДНК-штрихкодированию** насекомых, минирующих древесные растения в Сибири, в значительной степени пополнила знания о фауне этой плохо изученной группы насекомых в Северной Азии.
- Создание **библиотек ДНК-штрихкодов** позволит оперативно и точно диагностировать насекомых по их преимагинальным стадиям, проводить ревизии местной фауны, выявлять новые и инвазийные виды. Интеграция генетических, морфологических и экологических данных будет упрощать решение этих задач.
- **Молекулярно-генетический скрининг** минеров Сибири позволил выявить новые для науки виды насекомых и уточнить регионы распространения ранее известных видов.

Благодарности



Французский национальный фонд



PRATIQUE

EU программа FP6



ISEFOR

EU программа FP7



Грант Президента РФ



№ гранта 15-29-02645 офи_м



Благодарности



A **leading centre** in ecology & genetics
of forest insect pests **in Europe.**



Спасибо за Ваше внимание!

