

UDK: 632.754.1

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ ИНВАЗИВНОГО ВРЕДИТЕЛЯ *HALYOMORPNA HALYS* СОБРАННЫХ В АЛМАТИНСКОЙ ОБЛАСТИ

Турбекова Шырын Мейрамбековна – научный сотрудник, ТОО «Казахский научно-исследовательский институт защиты и карантина растений им. Ж. Жилембаева», Алматы, Казахстан

Турсунова Альнура Кайратовна – заведующая лабораторией молекулярной генетики и биохимии, ТОО «Казахский научно-исследовательский институт защиты и карантина растений им. Ж. Жилембаева», Алматы, Казахстан

Абылаева Улжалгас Аманилакызы – младший научный сотрудник, ТОО «Казахский научно-исследовательский институт защиты и карантина растений им. Ж. Жилембаева», Алматы, Казахстан

Мендибаева Гульназ Жеткергенкызы - PhD, заведующая лабораторией защиты леса и зеленых насаждений ТОО «Казахский НИИ защиты и карантина растений им. Ж. Жилембаева», Алматы, Казахстан

Мухамадиев Нуржан Серикханович - к.б.н., заведующий отделом биологической защиты растений ТОО «Казахский НИИ защиты и карантина растений им. Ж. Жилембаева», Алматы, Казахстан

Abstract: *The brown marmorated bug (*Halyomorpha halys*) is a highly polyphagous pest that causes significant damage to agricultural crops. The present study aimed at the molecular identification of *Halyomorpha halys* using primers to amplify the mitochondrial cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene. Bedbug samples were collected in 2024 from agricultural plots and private gardens in the Almaty region. As a result of molecular analysis, sequences were obtained that confirmed the identity of the samples with *Halyomorpha halys*, which emphasizes the effectiveness of the methods used for diagnosing this quarantine pest. The study provides important data for the management and monitoring of this pest in the region.*

Key words: *Halyomorpha halys, molecular genetic identification, mt COI, sequencing.*

Введение. Коричневый мраморный клоп *Halyomorpha halys* (Stål) (*Hemiptera: Pentatomidae*), высокополифаговый вредитель [1], который наносит значительный ущерб широкому спектру сельскохозяйственных культур и представляет глобальную экономическую угрозу для сельского хозяйства и садоводства [2]. На территории Республики Казахстан мраморный клоп был зарегистрирован в 2016 году [3]. Этот опасный многоядный вид включен в Единый перечень карантинных объектов Евразийского экономического союза, утвержденный Советом Евразийской экономической комиссии от 30 ноября 2016 г. №158 и вступивший в силу с 1 июля 2017 г.

Для надежной и быстрой диагностики, что крайне важно для регулирующих служб в стратегиях управления карантинными вредителями, такими как мраморный клоп (*Halyomorpha halys*), необходимо учитывать как морфологические, так и молекулярные методы. Митохондриальный ген цитохрома оксидазы субъединицы 1 (COI) является одним из самых популярных маркеров, используемых в молекулярной систематике. Целью данного исследования является молекулярная идентификация коричнево-мраморного клопа (*Halyomorpha halys*) с использованием генетических методов, а также оценка его распространения на территории Алматинской области Республики Казахстан.

Материалы и методы. Образцы *Halyomorpha halys* были собраны на сельскохозяйственных участках и в частных садах Алматинской области в 2024 году с применением ловушек на основе агрегационного феромона. Собранные образцы хранились в сухом виде или в 70% этаноле при температуре -20 °C до использования для молекулярного анализа.

Выделение общей геномной ДНК отдельных с образцов коричнево-мраморного клопа осуществлялось с помощью DNeasy Blood & Tissue (Qiagen, Germany) по инструкции, предложенной производителем данного реагента. ПЦР проводили с использованием универсальных праймеров: прямого праймера (LCO1490) 5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3' и обратного праймера (HCO2198) 5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3'. Для амплификации фрагмента COI митохондриального гена длиной ~710 п.н. реакцию ПЦР проводили

в объеме 25 мкл, содержащем 4 мкл 5-кратного реакционного буфера HF (Thermo Scientific), 1 мкл dNTPs, по 0,5 мкл каждого праймера, 0,2 мкл ДНК-полимеразы высокой точности Hot Start Phusion (Thermo Scientific) и 2 мкл матричной ДНК.

Амплификацию проводили с использованием термоциклира SimpliAmp Thermo Cycler (Life Technologies Corporation, Сингапур) с начальной стадией денатурации 30 секунд при температуре 98°C с последующим выполнением 30 циклов при 98°C в течение 10 секунд, 56°C в течение 30 секунд, 72°C в течение 30 секунд и заключительный этап удлинения при 72°C в течение 10 минут. После продукты ПЦР проверяли в 1 % агарозном геле для подтверждения амплификации гена *COI*. Положительные ампликоны гена *COI* из ПЦР-продукта были очищены реагентом для очистки ПЦР продукта EXOSAP-IT™ (Thermo Scientific) и секвенирован при помощи набора для определения последовательности циклов Big Dye Terminator V3.1 Выбранные очищенные продукты ПЦР были непосредственно секвенированы в обоих направлениях с использованием праймеров LCO1490 и HCO2198 по Сенгеру в генетическом секвенаторе 3500xL (Applied Biosystems, Genetic Analyzer). Последовательности генов COI образцов коричнево-мраморного клопа были подтверждены с помощью BLASTN [5] в базе данных GenBank Национального центра биотехнологической информации (NCBI) в целях идентификации, а виды идентифицировались с помощью системы BOLD [6].

Результаты и выводы. В ходе молекулярного анализа было получено 15 образцов коричнево-мраморного клопа (*Halyomorpha halys*) из Алматинской области, собранных в 2024 году. Все образцы были успешно амплифицированы с использованием праймеров LCO1490 и HCO2198, что подтвердило наличие фрагмента COI митохондриального гена длиной ~710 п.н.

Анализ продуктов ПЦР, проведенный с использованием 1% агарозного геля, показал четкие полосы, соответствующие ожидаемому размеру ампликона, что свидетельствует о успешной реакции.

Секвенирование продуктов ПЦР с использованием технологии Сенгера обеспечило получение высококачественных последовательностей, которые были успешно идентифицированы. Все последовательности были сопоставлены с базой

данных GenBank с использованием инструмента BLASTN, что подтвердило идентичность образцов с *Halyomorpha halys*, имеющими 99-100% сходство. Дополнительно, виды были идентифицированы с помощью системы BOLD, что также подтвердило соответствие собранных образцов *Halyomorpha halys*.

Эти результаты подчеркивают успешность использования молекулярных методов для идентификации мраморного клопа, что является важным для эффективного управления карантинными вредителями и разработки стратегий контроля.

Благодарность. Данная работа была выполнена при реализации грантового проекта АР22788572 «Разработка методов разведения энтомофагов и применение в биологической защите против коричнево-мраморного клопа (*Halyomorpha halys*)» в рамках МОН РК на 2024-2026 гг.

Список литературы:

1. Yan, J., Pal, C., Anderson, D., Vétek, G., Farkas, P., Burne, A., & Li, D. (2021). Genetic diversity analysis of brown marmorated stink bug, *Halyomorpha halys* based on mitochondrial COI and COII haplotypes. *BMC Genomic Data*, 22, 1-16.
2. Leskey, T. C., Hamilton, G. C., Nielsen, A. L., Polk, D. F., Rodriguez-Saona, C., Bergh, J. C., & Wright, S. E. (2012). Pest status of the brown marmorated stink bug, *Halyomorpha halys* in the USA. *Outlooks on Pest Management*, 23(5), 218-226.
3. Esenbekova P.A. First record of *Halyomorpha halys* (Stål, 1855) (*Heteroptera, Pentatomidae*) from Kazakhstan //Eurasian Entomol J. – 2017. – Vol. 16(1). – P. 23–24.
4. Tara D. Gariepy, Dmitry L. Musolin. Diversity and distribution of cytochrome oxidase I (COI) haplotypes of the brown marmorated stink bug, *Halyomorpha halys* Stål (*Hemiptera, Pentatomidae*), along the eastern front of its invasive range in Eurasia// NeoBiota. – 2021. -Vol. 68. – P. 53–77.
5. Altschul S. F. et al. Basic local alignment search tool //Journal of molecular biology. – 1990. – T. 215. – №. 3. – C. 403-410. Available online: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/> (accessed on 10 September 2019).

6. Ratnasingham S., Hebert P. D. N. Barcoding BOLD: The barcode of life data system (www. barcodinglife. org). //Molecular Ecology Notes. – 2007. – T. 7. – №. 3. – C. 355-364.