

UDK: 632.754.1

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

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

Жиембаева», Алматы, Казахстан

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

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

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

Мухамадиев Нуржан Серикханович - к.б.н., заведующий отделом биологической защиты растений ТОО «Казахский НИИ защиты и карантина растений им. Ж.Жиембаева», 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'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAAATCA-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 термоциклера 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 AP22788572 «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., Véték, 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. – С. 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](http://www.barcodinglife.org)). //Molecular Ecology Notes. – 2007. – T. 7. – №. 3. – C. 355-364.