

**МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДА
SPHEX LINNAEUS, 1758**

Кодиров Илхомжон Тожиахматович

Наманганский Государственный Университет преподаватель

Tel:949051285 -IxlosbekIsfandiyor@jmail.com

Ахмедова Зухра Юлдашевна

Институт Зоология АН Руз, заведующий лабораторией

к.б.н. z_akhmedova@mail.ru

Кодирова Нигора Муйдиновна

Учительница школы 86 города Намангана

Аннотация

В данной статье представлены сведения о молекулярно-генетическом анализе видов *S. flavipennis*, *S. funerarius* и *S. pruinosus*, относящихся к роду *Sphex* Linnaeus, 1758. А также, представлены морфобиологические особенности этих видов.

Ключевые слова: *Sphex*, *Nucleos*, суспензия, фрагмент, ДНК, род, вид.

**MOLECULAR-GENETIC ANALYSIS OF SPECIES BELONGING TO SPHEX
LINNAEUS, 1758 GENUS**

Qodirov Ilkhomdjon Tojiakhmatovich Namangan State University

Tel:949051285 -IxlosbekIsfandiyor@jmail.com

Akhmedova Zukhra Yuldashevna

Institute of Zoology, Academy of Sciences of the Republic of Uzbekistan,

Head of the laboratory

PhD z_akhmedova@mail.ru

Kodirova Nigora Muydinovna

School 86 teacher in Namangan city

Abstract

This paper provides information on the molecular genetic analysis of *S. flavipennis*, *S. funerarius* and *S. pruinosus* belonging to the genus *Sphex* Linnaeus, 1758. In addition, morpho-biological properties of this species are given.

Keywords: *Sphex*, *Nucleos*, suspension, fragment, DNA, genus, species

Введение

Средний размер (длина) представителей рода *Sphex* Linnaeus, 1758 составляет 11-47 мм [5], и большинство из них являются хищниками, которые питаются гусеницами бабочек (Noctuidae) и кузнечиками (Tettigoniidae) [9].

Представители семейства роющих ос (Sphecidae) распространены во всём мире, и в основном широко распространены в засушливых, полу засушливых и тропических регионах. В мире встречаются 779 видов и 19 родов, в Полярктике 260 видов 13 родов, в России – 68 видов 11 родов [1].

Согласно результатам морфологических исследований, проведённых по изучению видов *S. flavipennis*, *S. funerarius* и *S. Pruinusus*, относящихся к роду *Sphex*, у этих трёх видов по морфологическим признакам и морфометрическим размерам отличий не выявлено. Однако, после вычисления длины их передних крыльев и угол примыкания жил крыльев, доказано их отношение к трём видам [4].

Как показывают результаты морфологических исследований Moritz RFA 1992, определение видовой принадлежности представителей рода *Sphex* Linnaeus, 1758 проводилось по строению их крыльев, а также форме и строению клеточек на клыльях [7].

Целью данного исследования является проведение молекулярно-генетического анализа видов *S. flavipennis*, *S. funerarius* и *S. Pruinusus*, относящихся к роду *Sphex* Linnaeus, 1758.

Материалы и методы исследования

Для осуществления данного исследования в течение 2019-2022 годов накапливался энтомологический материал из горных, предгорных, холмистой и равнинных регионов Ферганской долины.

Накоплен ос рода *Sphex* Linnaeus, 1758 проводилось с помощью почвенных (земельных) ловушек Малеза, Мерике и Барбера. Кроме этого, также были использованы и энтомологические сети различных размеров [3]. Накопленный энтомологический материал хранился в 70% ном этаноловом растворе.

При определении видовой принадлежности представителей рода *Sphex* Linnaeus, 1758 были использованы сведения из стандартного определителя. Для выделения ДНК из образцов, хранящиеся в в 70% ном этаноловом растворе, сначала были отделены ножки мужских индивидов *S. flavipennis*, *S. funerarius* и *S. Pruinusus*, относящихся к роду *Sphex* Linnaeus, 1758, затем их оставляли на сухой бумаге на 10-15 минут при комнатной температуре для выпаривания спирта.

Для выделения ДНК представителей рода *Sphex* был использован метод [6].

Проведение полимеразно-цепной реакции на выделенных ДНК образцах проводилось с помощью автоматического программного амплификатора (PR-96E).

COI фрагменты нуклеотидов митохондриальной ДНК представителей рода *Sphex* выделялось с использованием LEP-F-прямой, 5-attcaaccaatcataaagatat-3 и LEP-R-обратной 5- taaacttctggatgtccsaaaaa-3 праймеров [8].

При приготовлении раствора Master-mix для ПЦР были использованы дистиллированная вода – 7,1 мкл, 10x ПЦР буфер -1 мкл, dNTP - 0,2 мкл, каждого праймера по 0,25 мкл, Taq-полимераза - 0,2 мкл=10 мкл.

Аmplификация фрагментов ДНК осуществлялась на термоцикле в течение 35 циклов. Процесс ПЦР проводился по следующей схеме: 1 этап – денатурация ДНК при температуре 95°C в течении 2 минут; 2 этап - денатурация ДНК при температуре 93°C в течении 20 секунд; 3 этап – примыкание праймеров к ДНК при температуре 52°C в течении 45 секунд; 4 этап – элонгирование при температуре 72°C в течении 2 минут; 5 этап – элонгация цепи при температуре 72°C в течении 10 минут. От второго до четвертого этапа процесс повторяется 35 в виде цикла.

Для определения длины фрагментов в качестве маркеров был использован ДНК λ бактериофага, гидролизованного эндонуклеазой PstI, а также специальный маркер Ladder 3-1 фирмы “Axigen”.

Анализ нуклеотидной последовательности осуществлялось с помощью специальной компьютерной программы Bioedit, Clustal W и DNASTarTM, RAUP4 и MEGA11.

Полученные результаты

В результате проведённых молекулярно-генетических исследований (сиквенс хроматография) выделены нуклеотиды длиной 640 пар из участка COI мДНК видов *S.flavipennis*, *S.funerarius* и *S.pruinosus*, а также для сравнительного анализа этих видов были использованы сведения видов *S.flavipennis* (входной номер: MH611040), *S.funerarius* (входной номер: MH610066) и *S.pruinosus* (входной номер: MH610705) из международной базы данных (рисунок 1)[10].

Как видно из рисунка вид *S.flavipennis* на 100% соответствует нуклеотидной последовательности *S.flavipennis* из международной базы данных, и это доказывает что он является видом *S.flavipennis*. Доказано, что виды *S.funerarius* и *S.pruinosus* на 100% похожи на *S.funerarius* и *S.pruinosus* из международной базы данных.

Согласно результатам исследования, у образцов *S.flavipennis* и *S.funerarius* выявлены отличия в местоположении 111 нуклеотидов, и общее отличие составило 17,2%. Между нуклеотидами видов *S.flavipennis* и *S.pruinosus* наблюдалось отличие в местоположении 123 нуклеотидов, где общее отличие составило 19,2%, а между видами *S.funerarius* и *S.pruinosus* - выявлены отличия в местоположении 115 нуклеотидов, где общее отличие составило 17,3%.


```

      10      20      30      40      50      60
S_flavipennis_Uz      AATATGATCA GGCATACTGG GATCTTCCCT AAGATTATTA ATCCGATTAG AGTTAGGTTT
S_flavipennis_MH611040
S_funerarius_Uz      .....C.....A.....TT.....TC.T.....TC.....A.....A.....
S_funerarius_MH6110066 .....C.....A.....TT.....TC.T.....TC.....A.....A.....
S_pruinosus_Uz      .....C.....A.....TT.....TA.C.....T.TC.....A.....
S_pruinosus_MH610705 .....C.....A.....TT.....TA.C.....T.TC.....A.....

      70      80      90      100     110     120
S_flavipennis_Uz      CCCAGGAAGA TTAATTAATA ATGATCAAAAT TTATAATAGA ATTATTACAG CTCATGCCTT
S_flavipennis_MH611040
S_funerarius_Uz      T.T.T.....C.....C.....C.....T.....
S_funerarius_MH6110066 T.T.T.....C.....C.....C.....T.....
S_pruinosus_Uz      T.....C.....C.....C.....T.....A.....
S_pruinosus_MH610705 T.....C.....C.....C.....T.....A.....

      130     140     150     160     170     180
S_flavipennis_Uz      TGTATAAATT TTTTATATA ATTATAACCAT TTATAATCGG AGGTTTCGGA AATTGATTAA
S_flavipennis_MH611040
S_funerarius_Uz      ..A.....T.....T.....T.....A.....T.....
S_funerarius_MH6110066 ..A.....T.....T.....T.....A.....T.....
S_pruinosus_Uz      ..A.....C.....T.....T.....T.....T.....G.....
S_pruinosus_MH610705 ..A.....C.....T.....T.....T.....T.....G.....

      190     200     210     220     230     240
S_flavipennis_Uz      TCCTCTAAT ATTAGGAGCA CCTGATATAG CTTACCTCG AATAACAAT ATAAGTTTTT
S_flavipennis_MH611040
S_funerarius_Uz      ..C..AT.....C.....A.T.A.....T.C.....A.....
S_funerarius_MH6110066 ..C..AT.....C.....A.T.A.....T.C.....A.....
S_pruinosus_Uz      ..A..T.....C.....C.....T.A.....T.....A.....
S_pruinosus_MH610705 ..A..T.....C.....C.....T.A.....T.....A.....

      250     260     270     280     290     300
S_flavipennis_Uz      GACTTCTTCC CCCATCTATA A TTTTATTA ACAATAAGAA TAATTTTAGG TTCAGGTACA
S_flavipennis_MH611040
S_funerarius_Uz      .....C.....T.C.....CC.....C.....A.C.....
S_funerarius_MH6110066 .....C.....T.C.....CC.....C.....A.C.....
S_pruinosus_Uz      ..AT.A..A..G..T.T..A.C.....A.....T.A.....
S_pruinosus_MH610705 ..AT.A..A..G..T.T..A.C.....A.....T.A.....

      310     320     330     340     350     360
S_flavipennis_Uz      GGAACAGGAT GAACAGTTTA TCCTCCCTTA TCCTCTATTA TATCCACAA TAGAGTTTCT
S_flavipennis_MH611040
S_funerarius_Uz      ..T.....T.....G..C..C..C..TT..A.....C.....T.....AC..C.....
S_funerarius_MH6110066 ..T.....T.....G..C..C..C..TT..A.....C.....T.....AC..C.....
S_pruinosus_Uz      .....T.....A..TT..T.....T.....T.....CTCT..A..A.....
S_pruinosus_MH610705 .....T.....A..TT..T.....T.....T.....CTCT..A..A.....

      370     380     390     400     410     420
S_flavipennis_Uz      GTAGATTTGA GAATTTTATT CTCTCATATC GCAGGAATTT CATCAATTAT AGGAACAATT
S_flavipennis_MH611040
S_funerarius_Uz      .....A.....C.TCTC..C.T.....T.....T.....
S_funerarius_MH6110066 .....A.....C.TCTC..C.T.....T.....T.....
S_pruinosus_Uz      .....A.....C.TCTA..T.A.....CA.....T.T..C.....
S_pruinosus_MH610705 .....A.....C.TCTA..T.A.....CA.....T.T..C.....

      430     440     450     460     470     480
S_flavipennis_Uz      AATTTTATTA CAACCATTTT AAATATAAAA AATCCCTAAT TATCTAT AG ATAAATTACC
S_flavipennis_MH611040
S_funerarius_Uz      .....C.....G.AA.C..A.....
S_funerarius_MH6110066 .....C.....G.AA.C..A.....
S_pruinosus_Uz      .....T.A.....AAA.A..AAT.T.A.....
S_pruinosus_MH610705 .....T.A.....AAA.A..AT.AAT.T.A.....

      490     500     510     520     530     540
S_flavipennis_Uz      CTATTTCACC TGATCTATTT TTATTACAAC CATCTTACTT TTAATTTCTC TACCAGTATT
S_flavipennis_MH611040
S_funerarius_Uz      .....T.TT.....A.....C.....A.T..T.A.....T.....C.....
S_funerarius_MH6110066 .....T.TT.....A.....C.....A.T..T.A.....T.....C.....
S_pruinosus_Uz      TC.....T.T.....A.....A.T..T.A.A.....C..AT.....
S_pruinosus_MH610705 TC.....T.T.....A.....A.T..T.A.A.....C..AT.....

      550     560     570     580     590     600
S_flavipennis_Uz      AGCTGGAGCA CTCACTATAT TATTAACCGA CCGAAATTTA AATACAACAT TCTT GACCC
S_flavipennis_MH611040
S_funerarius_Uz      T.A.....T.A.....A.....A.....T.....T..T..T.....
S_funerarius_MH6110066 T.A.....T.A.....A.....A.....T.....T..T..T.....
S_pruinosus_Uz      ..C.....T.A.....C..C..A..T.....TT.....T.....T.....
S_pruinosus_MH610705 ..C.....T.A.....C..C..A..T.....TT.....T.....T.....

      610     620     630     640
S_flavipennis_Uz      GATCGGAGGA GGTGATCCTA TTTTATACCA ACATTTATTT
S_flavipennis_MH611040
S_funerarius_Uz      A.T.....A.....C..T.....C.....
S_funerarius_MH6110066 A.T.....A.....C..T.....C.....
S_pruinosus_Uz      T.T.....A..C.....C.....C.....
S_pruinosus_MH610705 T.T.....A..C.....C.....C.....

```

Рисунок 1. Сравнение нуклеотидной последовательности участка COI видов *S.flavipennis*, *S.funerarius* и *S.pruinosus*, относящихся к роду *Sphex*. В COI фрагменте мДНК видов *S flavipennis*, *S. funerarius* и *S.pruinosus* точками обозначены одинаковые нуклеотидные основы в направлении от 5' до конца 3' фрагмента.

Вывод

В результате молекулярно-генетических исследований доказано, что виды *S.flavipennis*, *S.funerarius* и *S.pruinosus* из рода *Sphex* Linnaeus, 1758 являются отдельными видами.

ЛИТЕРАТУРА

1. Белокобыльс С.А., Лелея А.С. Аннотированный каталог перепончатокрылых насекомых России // Труды Зоологического института РАН, приложение 6, 2017 г., 475 с.
2. Правдин Ф.Н. Экологическая география насекомых Средней Азии // Ортоптероиды. – М.: Наука, 1978. – 270.
3. Ayla Tüzün. Significance of wing morphometry in distinguishing some of the hymenoptera species // 2009. African Journal of Biotechnology Vol. 8 (14), pp. 3353-3363.c.
4. Hensen R.V. Review. Of Malesian Sphecina (Hymenoptera, Sphecidae, Sphecinae) // Tijdschriftvoor Entomologie 1991: 134:9-30.
5. Issa M.R.C., Figueiredo V.L.C., Jong D. De, Sakamoto C.H. and. Simões Z.L.P. Rapid method for DNA extraction from the honey bee *Apis mellifera* and the parasitic bee mite *Varroa destructor* using lysis buffer and proteinase K // Genetics and Molecular Research, 2013, 12 (4): 4846-4854 p.
6. Moritz R. F. A. The limitations of biometric control on pure race breeding in *Apis mellifera* // J. Apicult. (1992). Res. 30 (2): 54-59.
7. Paul D. N. Hebert, Erin H. Penton, John M. Burns, Daniel H. Janzen, and Winnie Hallwachs. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator* // PNAS., -2004 vol., 101., 14812–14817 p.
8. Roche G. C. Conspectus of the sphecid wasps of Egypt (Hymenoptera: Ampulicidae, Sphecidae, Crabronidae) // Egyptian Journal of Natural History 2007: 4:12-149.
9. <https://www.gbif.org/species>.