

Получение COI-баркодов из смешанных проб беспозвоночных с использованием нанопорового секвенирования



Кривошеева Валерия Александровна
Погодаев Михаил Михайлович

Куратор: Сальницкая Мария Алексеевна

*Лаборатория систематики и филогенетики
насекомых, Институт экологической и
сельскохозяйственной биологии (Х-БИО), Тюменский
Государственный Университет,
г. Тюмень*

Лаборатория систематики и филогенетики насекомых

Кавказский энтомологический бюллетень 18(Suppl.): 3–149

© Caucasian Entomological Bulletin 2022

Rove beetles of the open plains of the South European Russia: a review with the key to genera and annotated species checklist (Coleoptera: Staphylinidae)

Dtsch. Entomol. Z. 72 (1) 2025, 101–117 | DOI 10.3897/dez.72.143622



Identification of West Siberian *Quedius* (Coleoptera, Staphylinidae) by COI barcodes calls for integrative taxonomy and curation of public

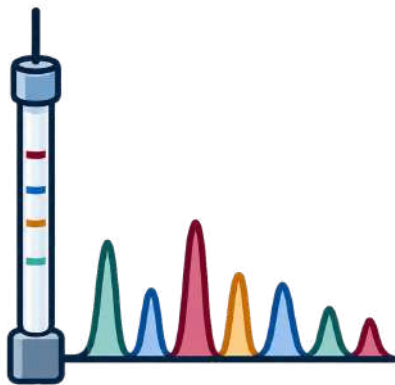
Alpine Entomology 7 2023, 153–166 | DOI 10.3897/alpento.7.111214



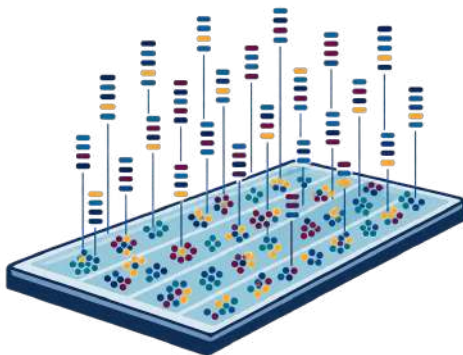
Micro-endemism pattern and *Wolbachia* infection of *Quedius obliqueseriatus* (Coleoptera, Staphylinidae), a montane rove beetle endemic of the North-Western Caucasus

Технологии секвенирования

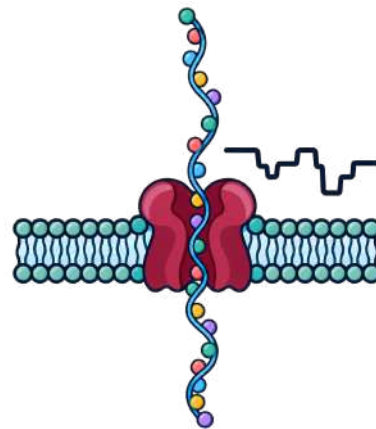
Секвенирование по Сэнгеру



Illumina

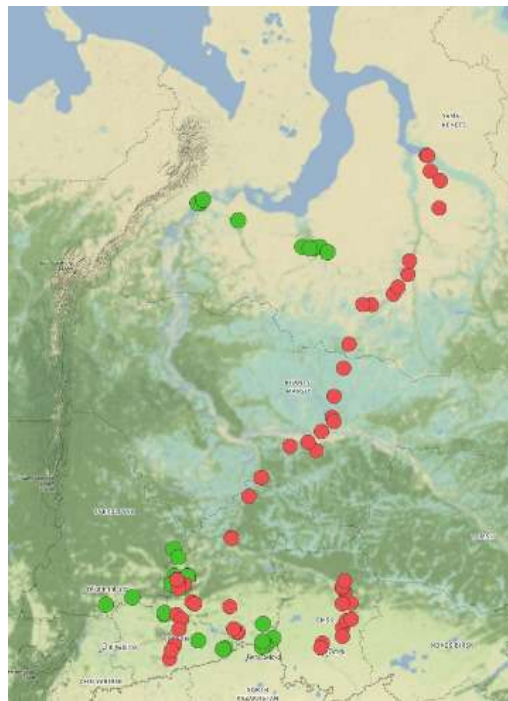


Oxford Nanopore

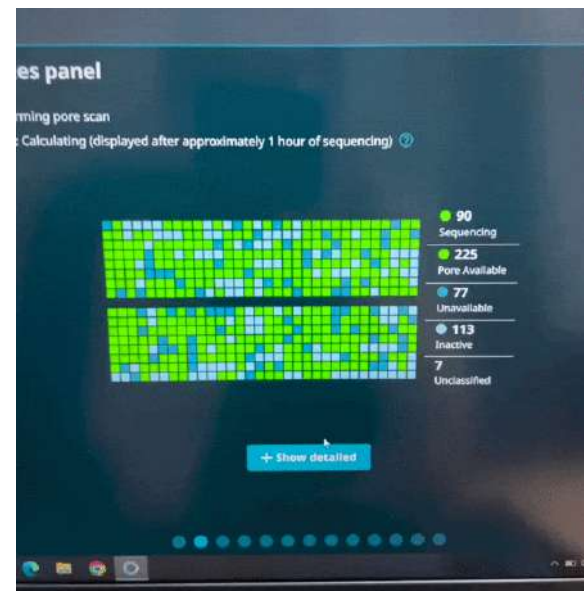
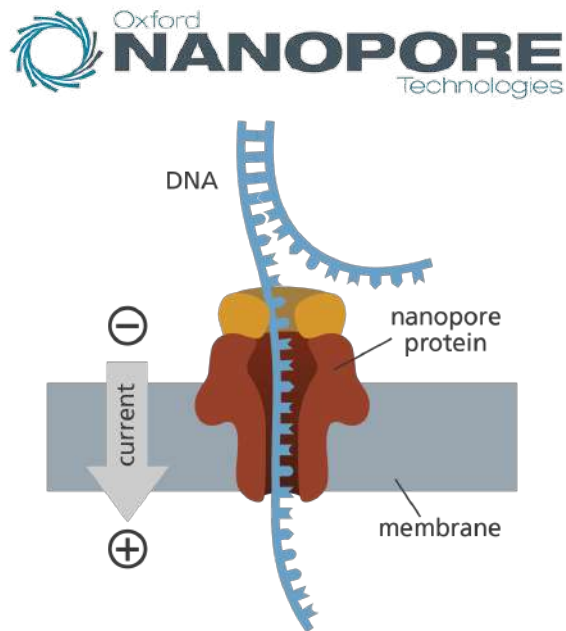


Стафилиниды Западной Сибири

Исследуемые подсемейства - *Staphylininae* и *Paederinae*. Материал собран в 2022–2023 годах в 96 точках Западной Сибири.



Секвенирование на Oxford Nanopore MinION

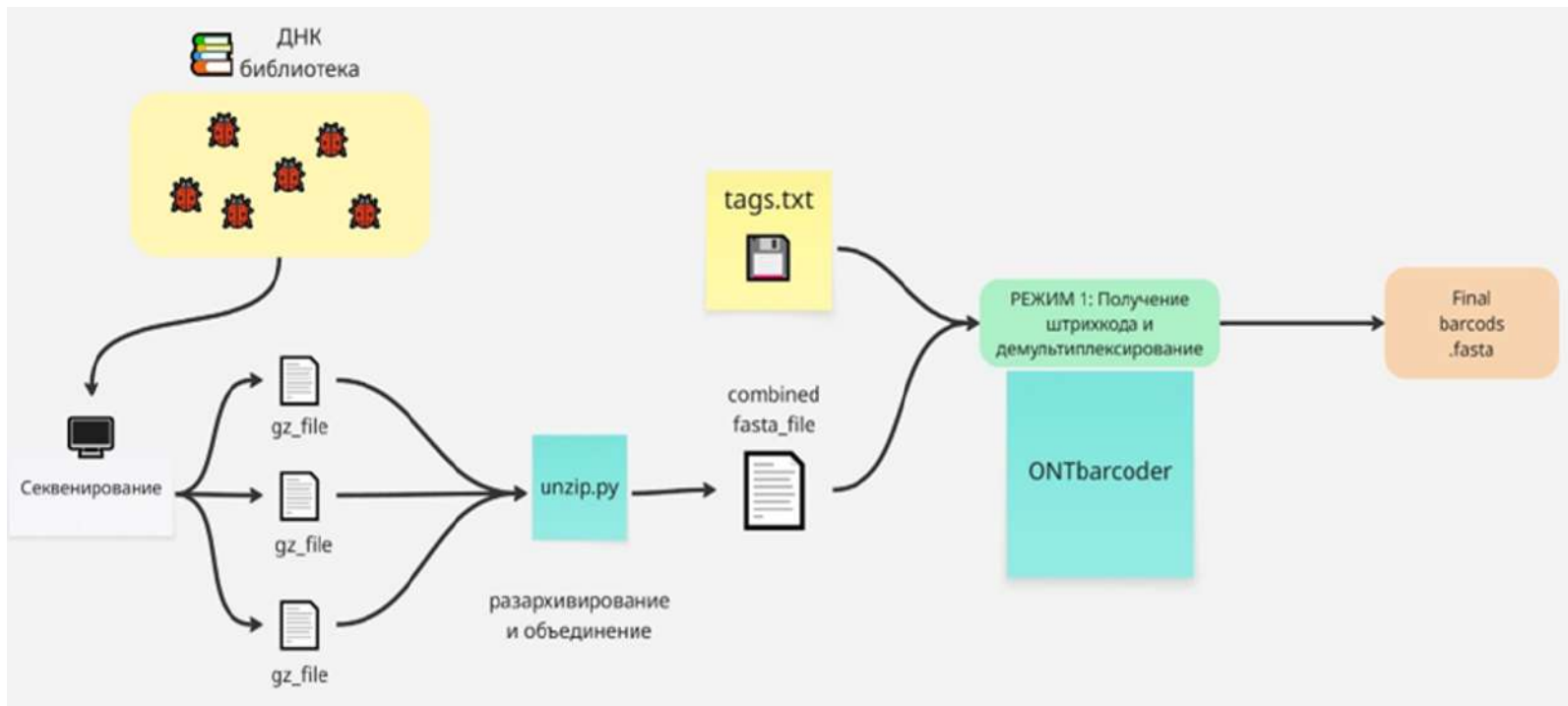


Праймеры с нуклеотидными тегами

К прайм		F1	F2	F3	F4	F5	F6	
Наприм	R1	541	542	543	544	545	546	
Прайме		F1R1	F2R1	F3R1	F4R1	F5R1	F6R1	
Тег + пр	R2	547	548	549	550	551	552	
		F1R2	F2R2	F3R2	F4R2	F5R2	F6R2	ATTGG
У кажд	R3	553	554	555	556	557	558	
		F1R3	F2R3	F3R3	F4R3	F5R3	F6R3	
	R4	559	560	561	562	563	564	ого тегов.
		F1R4	F2R4	F3R4	F4R4	F5R4	F6R4	
	R5	565	566	567	568	569	570	
		F1R5	F2R5	F3R5	F4R5	F5R5	F6R5	
	R6	571	572	573	574	575	576	
		F1R6	F2R6	F3R6	F4R6	F5R6	F6R6	

Протокол обработки данных

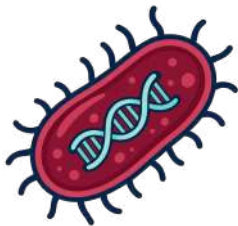
При помощи программы ONTbarcode проводится **демультиплексирование** (разделение по тегам на образцы) и **получение баркода** (путем объединения нескольких последовательностей образца в одну консенсусную)



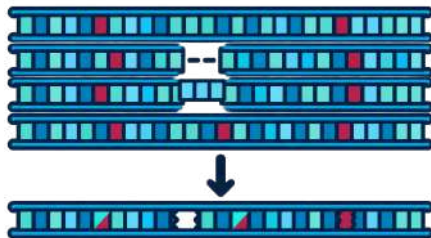
Возникла проблема

Секвенировали **95 образцов** подсемейства **Staphylininae**. После обработки данных корректные COI-баркоды удалось получить **только для 80 образцов**.

Проблемные случаи



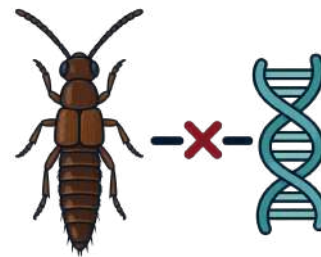
7 - последовательности
Wolbachia



3 - ошибки сборки
консенсуса



3 - *Bos taurus*



2 - несоответствие
морфологическому
определению

Дополнительный этап - картирование

Картирование — сопоставление прочтений с эталонными последовательностями.

Использовалось для разделения смеси прочтений на две группы - “жук” и “*wolbachia*”.

Прочтения одного образца



Картирование на базу данных

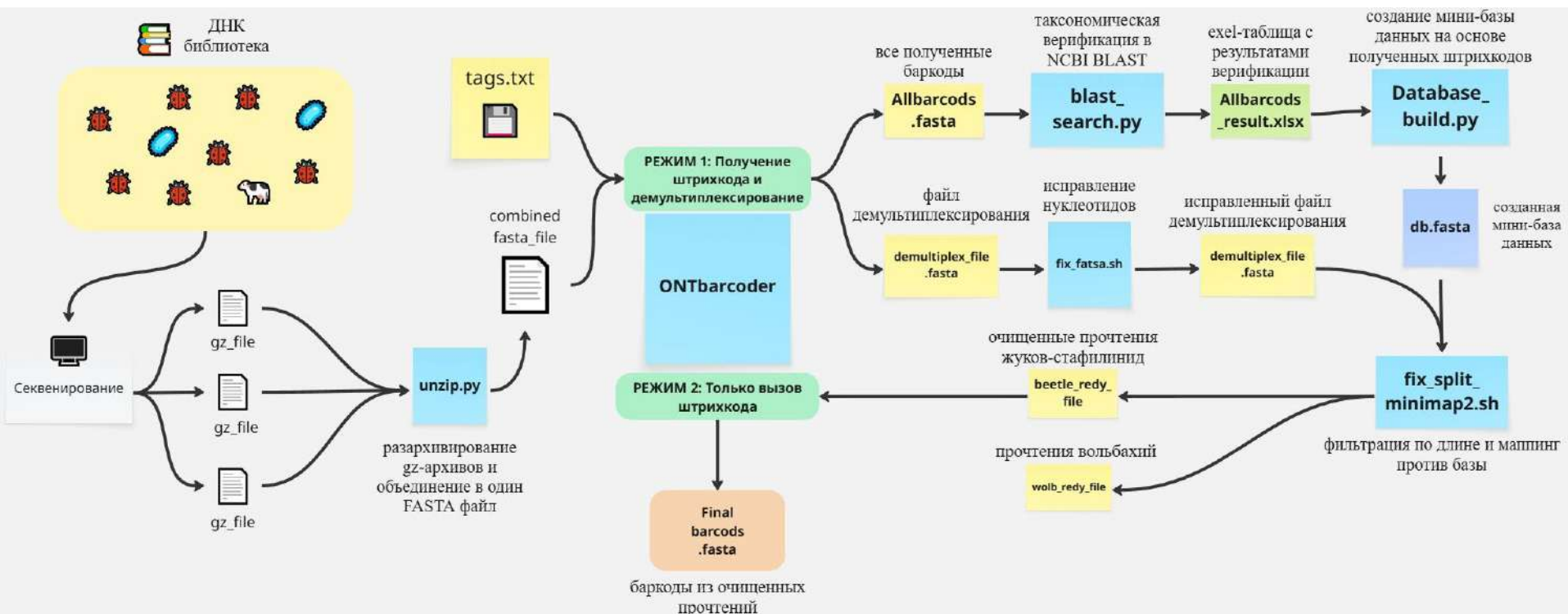


Распределение последовательностей по группам “жук” и “*wolbachia*”



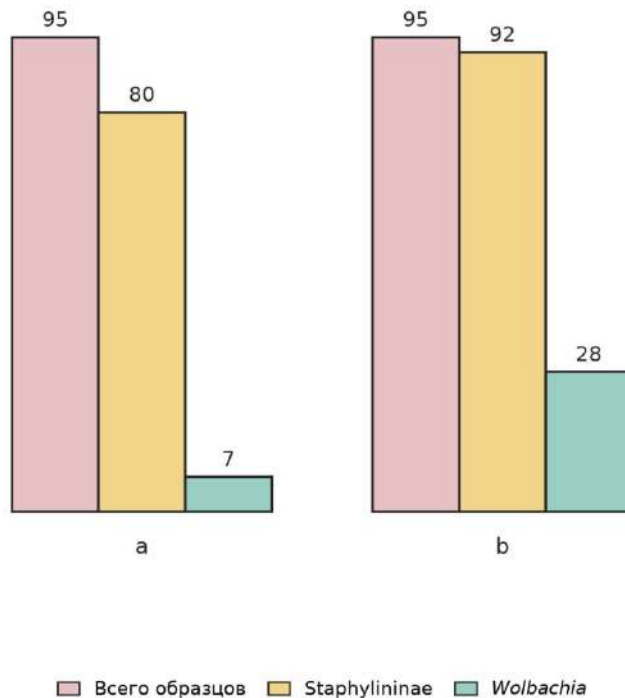
Объединение последовательностей в каждой группе в итоговый консенсус

Дополненный протокол обработки данных



Результаты после картирования

- корректные баркоды стафилинид получены для **92 из 95 образцов**
- дополнительно получены **для 28 образцов** последовательности *Wolbachia*
- 3 неуспешных случая связаны с малым количеством прочтений или необходимостью дополнительной таксономической проверки



Применение картирования к другому типу смешанных проб

Объект исследования - краснотелковые клещи *Trombiculidae*, ассоциированные с рукокрылыми.

При выделении ДНК из клеща в пробе может присутствовать ДНК хозяина.

Такая проба содержит две биологически значимые группы последовательностей - клеща и рукокрылого.

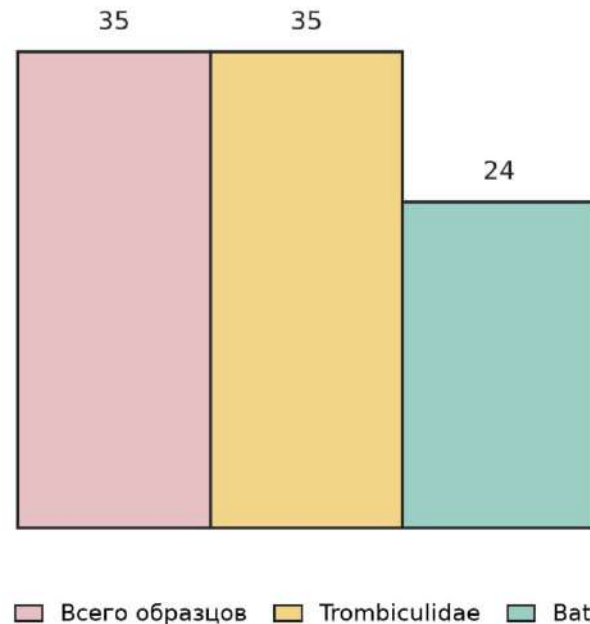


Результаты обработки данных по Trombiculidae

COI-баркоды клещей получены для **35 из 35** образцов.

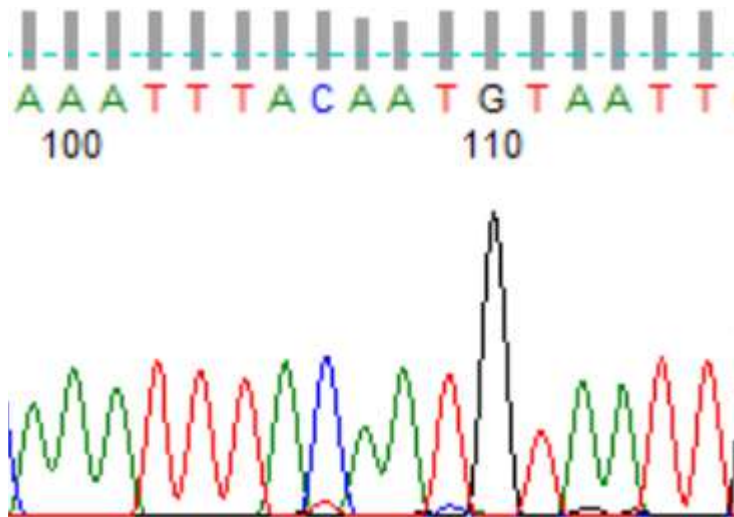
Для **24 из этих образцов** дополнительно получены COI-баркоды рукокрылых.

Одна смешанная проба может дать не только целевой баркод, но и дополнительную информацию о хозяине.

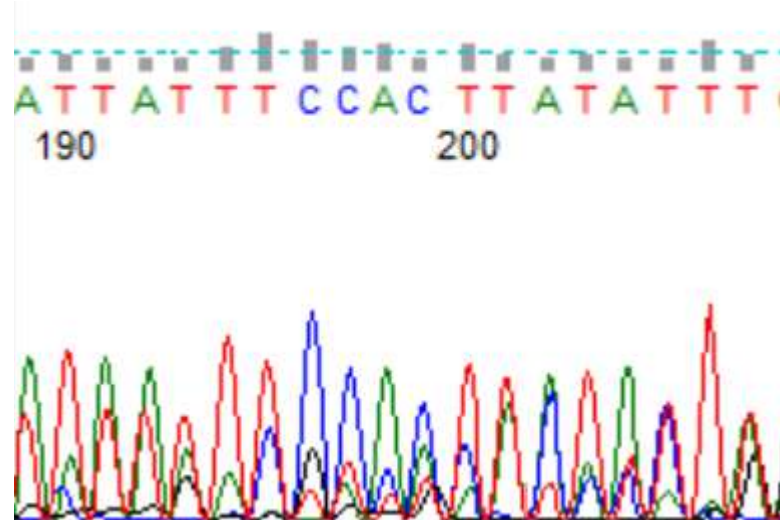


Проблемные результаты Сэнгера

Чистая хроматограмма



Наложение пиков



Перспективы использования подхода

Метод может быть полезен при работе с образцами, содержащими ДНК:

Эндосимбионтов

Хозяев и паразитов

Объектов питания

Загрязнителей

Подход позволяет повысить выход корректных COI-баркодов при работе с проблемным материалом

Благодарю за внимание!

Благодарности:

Сальницкой Марии Алексеевне
Казакову Денису Васильевичу
Солодовникову Алексею
Аслаку Хансену и др.

Кривошеева Валерия Александровна

Контактная информация:

E-mail: v.a.krivosheeva@utmn.ru

krivosheeva.valery@gmail.com

ResearchGate:

researchgate.net/profile/Valeria-Krivosheeva