

*As a manuscript*

**NASERZADEH YOUSEF**

**MOLECULAR IDENTIFICATION AND DESIGN OF SPECIFIC PRIMERS FOR  
QUARANTINE AND NON-QUARANTINE FRUIT FLY SPECIES (*DROSOPHILA  
SUZUKII*, *DROSOPHILA SIMULANS* AND *DROSOPHILA MELONOGASTER*)**

**Specialty 4. 1. 3 Agrochemistry, agrosoil science, plant protection and quarantine**

**ABSTRACT**

dissertation for a degree  
candidate of biological sciences

Moscow- 2022

The work was carried out at the agro-biotechnological department of the Agrarian-Technological Institute of the RUDN University of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation

**Scientific supervisor:**

Doctor of agricultural sciences, Associate professor,  
RUDN, department of Agrobiotechnology,  
professor

**Pakina Elena Nikolaevna**

**Official opponents:**

Doctor of Agricultural Sciences,  
Head of the Department of Plant Protection and Horticulture,  
Vavilov University

**Eskov Ivan Dmitrievich**

Candidate of Biological Sciences,  
Head of the Quarantine Department of FGBU  
"North Caucasian Interregional Veterinary Laboratory"

**Pimenov Sergey Viktorovich**

**Lead organization:**

Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education "Crimean Federal University named after V.I. Vernadsky"

Defense will take place «26 » December 2022 year at 12-00 at a meeting of the dissertation council ПДЦ 2021.002 at FGAOU VO «Peoples Friendship University of Russia» located at: 117198, Moscow, Miklukho-Maklaya str., 8/2

The dissertation can be found in the reading room of the UNIBC (Scientific library) FGAOU VO «Peoples Friendship University of Russia» located at: 117198, Moscow, Miklukho-Maklaya str., 6. and on the website <https://www.rudn.ru/science/dissovet>.

The abstract was sent «\_\_» \_\_\_\_\_ 2022 y.

Scientific secretary  
of the dissertation council ПДЦ 2021.002  
candidate of agricultural sciences

**Vvedensky Valentin Valentinovich**

## I. GENERAL DESCRIPTION OF DISSERTATION

**The relevance of research.** *Drosophila* or the fruit fly is a small insect whose habitat is mainly associated with overripe or rotting fruits and vegetables. About 1500 species of the genus *Drosophila* are known. Flies *Drosophila* sp. sometimes called small fruit flies. However, true fruit flies belong to the Tephritidae family. Not only are they larger, but they are common and important agricultural pests. The vast majority of fruit flies are associated with rotten or overripe fruit and are noxious pests. However, some species, such as the spotted winged fruit fly, *Drosophila suzukii* (Matsumura), can infect immature fruits and are of particular economic importance. First discovered in the continental United States in August 2008, *D. suzukii* had become a significant threat to fruit crops. This species has a high reproductive rate and a short generation time; *D. suzukii* could theoretically have up to 13 generations per year, which could allow rapid spread if suitable hosts are available.

One of the fruit fly species that share a genetic ancestor with *D. melanogaster* in *Drosophila simulans*. According to studies, Alfred Sturtevant made the discovery of fly genetics in 1919, when he noticed that the *D. melanogaster* and *D. simulans* flies used in Thomas Hunt Morgan's Columbia University laboratory were actually two different species. Males have different external genitalia, and viewers with laboratory training may tell females apart based on their color and outward appearance currently, the most widely used strategy for the control of *D. simulans* in agriculture is the use of specialized chemicals. Because insecticides are aimed mainly at adults, *D. simulans*, which have a high reproductive capacity and numerous offspring, their repeated application is necessary. Currently, there are almost no countries left in Europe where representatives of *Drosophila simulans* have not been found. *Drosophila simulans* is a fly species closely related to *D. melanogaster* and belonging to the same subgroup of *D. melanogaster* species. This pest (*Drosophila simulans*) is not yet included in the Russian list of quarantine objects, but because it is extremely close to *D. suzukii*, it has been investigated as part of this project. *D. melanogaster* is an invasive agricultural pest of small stone fruits native to Asia. In 2008, it was first discovered in California, Spain, and Italy; today this species is present in most of North America, and Europe, and has been found in South America. Most vinegar flies lay their eggs in rotting fruit, but *D. suzukii* females have a serrated ovipositor (among other adaptations) that allows them to saw through the skin of fresh fruit to lay their eggs. The extremely wide range of hosts (more than 30 species of fruit crops) and high dispersal potential make *D. suzukii* invasion a serious source of economic damage. The immature developmental stages of *D. suzukii* are difficult to distinguish from other *Drosophilae's*, posing problems for research and enforcement of quarantine restrictions aimed at preventing the spread of this pest in fruit exports. Unlike other vinegar flies, this species is able to lay eggs and develop into healthy ripening soft fruits. This species originates from East Asia and has recently spread to Europe, and North and South America. Since 2011, *D. suzukii* has been included in the EPPO A2 list (EPPO 2020). Its presence has been registered in at least 20 European countries. In 2014, *D. suzukii* was recorded for the first time on the Black Sea coast of Crimea. However, *D. suzukii* has not been reported anywhere else in Russia, so such projects have a preventive aspect. In this study, we have developed a highly specific and highly sensitive real-time PCR variant for the accurate identification of *Drosophila* sp. In this regard, an urgent problem is the development of fast and accurate molecular test systems for the identification of dangerous species of fruit flies *Drosophila* sp., such as *D. suzukii*, *D. simulans*, and *D. melanogaster*.

**The purpose of the study.** A large proportion of *Drosophila* sp. in transit or discovered in orchard surveys are in the larval stages, as their feeding leads to observable damage to the produce. As discussed above, it is nearly impossible to identify them accurately, unless they are reared to adults. This can be a high-risk task, as many facilities around the world may not have the quarantine security required

for rearing pests such as *D. suzukii*, and failure rate of rearing from eggs can be very high. Additionally, the lengthy time component of rearing to identification may be frustrating when hundreds of thousands to millions of dollars' worth of fresh produce is at stake. In such circumstances, molecular identification techniques can provide the solution. Polymerase chain reaction (PCR)-based methods have been used for several decades now for the identification of pests and diseases all around the world.

Classical identification methods of fruit flies are based on morphological and anatomical differences using microscopic image analysis. Morphological identification is one of the cheaper methods of identification, helps to correlate morphology with possible function, and is an essential tool for morphologists. While it is not adequate for some *Drosophila* species such as *D. simulans*, which have many similarities, because they are morphologically difficult to distinguish. In the molecular identification method, since DNA is usually needed, there are various methods to make the collection and storage of DNA samples simple and efficient, and it is also found in all biological tissues or fluids with nucleated cells. In summary, identifying a fruit fly species with a high level of confidence based on morphology alone can be difficult for non-experts, and accurate identification requires integrating sub-organismal data such as DNA sequences. Many DNA-based methods have been developed to identify insects and fruit flies. These can be broadly categorized into fingerprint and nucleotide-based methods.

Each of these methods has its own advantages and disadvantages compared to other fruit fly identification methods, DNA-based or otherwise. Among these detection methods, Real-time PCR is favorable for us due to its simplicity, speed, specificity, no need for expensive equipment, and highly skilled experts for analysis.

There are several universal primers for this method that can be used for the general identification of *Drosophila* sp. However, a universal primer is an all-purpose coating that prepares the surface for the subsequent coating. Choosing the right primers is probably the most important factor affecting (PCR) or (Real-time PCR). Specific amplification of a target requires that the primers do not match other targets in specific directions and at certain distances, which allows for unwanted amplification. Therefore, in this research, more than 9 pairs of new primers were designed and made to increase the selectivity of analysis for *D. suzukii*, *D. simulans*, and *D. melanogaster* species.

To achieve this, the following **objectives** were set;

1. Development of accurate and sensitive primers for real-time PCR and classical PCR for the detection of non-quarantine pests *Drosophila melanogaster*.
2. Development of an accurate and sensitive primer for real-time PCR and classical PCR for the detection of non-quarantine pests *Drosophila simulans*.
3. Development of accurate and sensitive primers for real-time PCR and classical PCR for the detection of quarantine pests *Drosophila suzukii*.
4. Optimization of the developed primers on different types of fruit flies that are genetically closely related to each other.
5. Checking the selectivity of primers with different types as a marker.
6. Study of the developed primers for evaluation and analysis of efficiency in agricultural laboratories in Iran and Russia.

In this paper, theoretical methods were used for the initial study and review of the scientific literature. Most of the project is hands-on and done in the lab and then carefully studied by various software methods.

**The object of the study.** Since today in Russia, with a large volume of imports and exports of fruits and vegetables, there is no full-fledged analysis of *Drosophila suzukii*, including accurate diagnostic methods, the purpose of this study was to find a way to quickly identify this type of dangerous

fruit flies, as well as improve methods for identifying closely related species of *Drosophila simulans* and *Drosophila melanogaster*.

**The subject of the study.** Collected and analyzed the received material, processed and interpreted the data. The new primers developed to identification of quarantine and non-quarantine fruit fly species between 2018 to 2022).

**Scientific novelty.** As part of dissertation research for the first time:

- A phylogenetic analysis of *Drosophila* species was carried out together with other closely related species as a marker.
- Primers have been developed that accurately identify the desired genetic regions in *Drosophila suzukii*, *Drosophila simulans*, *Drosophila melanogaster* species, as well as primers using markers to confirm their accuracy for real-time PCR and classical PCR
- Created primers are used to evaluate the effectiveness of existing diagnostic methods in agricultural laboratories in Iran.
- Conducted large-scale molecular identification with precise differentiation of species to identify quarantine and non-quarantine objects *D. suzukii*, *D.simulans*, *D. melanogaster* at the All-Russian Center for Plant Quarantine (VNIIKR).
- Conducted molecular identification with precise delineation of species to identify fruit flies *D. suzukii*, *D.simulans*, *D. melanogaster* in Iran.

**The theoretical significance of the work.** The theoretical and practical significance lies in the development of new specific primers for *Drosophila* sp. Thus, in this dissertation, for the identification of *Drosophila* species, nine pairs of primers were developed. For the molecular identification of *D. suzukii* five pairs of primers were developed (12. dsuz. F/R, 12. dsuz. F/R and 3. dsuz. F/R for classical PCR) and (1. dsuz. F/R. Probe, 3. dsuz. F/R for real-time PCR).

For molecular identification of *D. melanogaster*, two pairs of primers were developed. (4.DM F/R for classical PCR) and (3.DM.F/R.Probe for real-time PCR).

For molecular identification of *D. simulans*, two pairs of primers were developed. (6.ds F/R for classical PCR) and (ds.F/R.Probe for real-time PCR).

According to the test results of primers developed in Iran, they can be used in laboratories in other countries.

The proposed methods can be used for express diagnostics of *Drosophila* sp. Designing specific primers for populations of interest can be a useful tool to help biologists expand and continue their research.

**Methodology and research methods.** DNA extraction from the test materials (insects and larvae) was done by treating the samples with proteinase K and then removing the protein without extracting with organic solvents and using the Extran-2 DNA kit, kit number NG-511-100 (Synthol). , Russian Federation) according to the manufacturer's instructions. DNA extracts were measured using a NanoDrop 2000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific Inc., USA). We studied samples from larvae, pupae and isolated DNA. Sequencing was performed using an ABI-3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA). The National Center for Biotechnology Information (NCBI) BLAST website (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) performed an initial comparison of sample results with the GenBank genetic sequence database. Sequences were verified, aligned and edited by BioEdit v.7.0.5. In BioEdit, sequences were aligned with additional sequences collected from GenBank. The first primer targeting *Drosophila* sp was developed and used by Primer Premier 5 (PREMIER Biosoft International, Palo Alto, USA). To evaluate the effectiveness of the primers more precisely, we tested them on other fruit fly species in the laboratory of Varamin University of Agriculture, Tehran province. The obtained results are discussed in the "Results" section.

### **Provisions for the Defence:**

- Study of the molecular variability of *Drosophila* sp. population.
- Validate and improve classical and real-time PCR methods for *D. suzukii*, *D. simulans* and *D. melanogaster* in Russian federation and Iran.
- Development of new specific real-time and classical primers for molecular diagnostics of *Drosophila* sp.
- Assess the accuracy of the results obtained with the developed primers.
- Study of the selectivity of the designed primers among related species.
- Compare the classical and real-time PCR.

**The degree of reliability and approbation of the results.** The results obtained in the framework of the dissertation were reported with title: (SPECIFIC IDENTIFICATION METHOD FOR DROSOPHILA MELANOGASTER), and discussed at НАУКА И ИННОВАЦИИ-СОВРЕМЕННЫЕ КОНЦЕПЦИИ (Moscow, May 22, 2020) / resp. ed. D.R. Khismatullin. – Moscow: Infiniti Publishing House.

**The dissertation author's independent contribution.** The applicant participated in setting the goal and objectives of the study; collected and analyzed the received material, processed and interpreted the data, prepared publications in co-authorship. The dissertation work is the result of research conducted by the author at the Agrobiotechnological Department of ATI RUDN University and on the basis of the «All-Russian Center for Plant Quarantine in 2018–2022».

**Research references.** Include 84 titles: directories and regulatory documents, dissertations and abstracts, books and articles in English, online and offline resources.

**Approbation of the research results.** 7 articles were published based on the dissertation research findings, including 2 in scientific journals listed in the International Journal database and 2 in the Scopus databases, 2 in peer-reviewed journals listed on the BAK list, and 1 original scientific articles presented at conferences.

**The structure of the dissertation research.** The dissertation work consists of introduction, 3 chapters, conclusions and bibliography. The material is presented on 127 pages, includes 79 tables, 52 figures and diagrams. The list of references includes 84 sources.

### **Acknowledgement**

The author expresses his gratitude to Galina Nikolaevna Bondarenko, Candidate of Biological Sciences, and Head of the Testing Laboratory Center of the All-Russian Center for Plant Quarantine for invaluable assistance during the research and the skills gained in the process of working on the dissertation

## **II. MAIN CONTENT OF WORK**

**Introduction.** The relevance and scientific novelty of the study are substantiated; the goal and objectives are formulated, as well as the provisions submitted for defense.

**Chapter 1. Literature Review.** This chapter presents and discusses general information about quarantine and non-quarantine fruit fly species *Drosophila* (*D. suzukii*, *D. simulans* and *D. melanogaster*). Information on existing methods of molecular detection is presented and the use of newly developed primers for identification analysis and comparison of different types. Distribution and harmfulness of *Drosophila* sp. in Russia and Iran.

Taxonomy, information on species and their life cycle, morphological characteristics, geographical distribution, list of host plants, methods of distribution, economic importance in global distribution, and

problems of application. Introduction of universal primers. Designing new primers and their development and improvement methods.

## **Chapter 2. Material and methods**

This study was carried out during 2018-2021 at the All-Russian Center for Plant Quarantine (VNIIKR) and the Agrarian and Technological Institute of RUDN University, Moscow, Russia.

DNA extraction from the test material (insects and larvae) was carried out by treating the samples with Proteinase K, followed by protein removal without extraction with organic solvents and using the DNA Extran-2 kit, kit no. NG-511-100 (Synthol, Russian Federation) according to manufacturer's instructions. Since individuals of the *Drosophilae species* are very small, homogenization with pistils was carried out by the physical destruction of tissues. This rapid DNA extraction method provides a time advantage, especially important for emergency diagnostic tests. DNA extracts were quantified using a NanoDrop 2000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific Inc., USA).

In addition, to study the species composition of the genus *Drosophila* spp., we selected material from Egypt, Turkey, Mexico, Iran, as well as on the territory of the Russian Federation; Various hosts have been selected, including sugar apple, citrus, berries, raspberries (larvae), blueberries (larvae and pupae), melon, grapes, apple, pomegranates, persimmons, tangerines, mangoes. We studied samples of larvae, pupae and isolated DNA. All material (plant tissue and isolated DNA) was stored at -20°C.

The first step to effectively manage the growth of a pest population is its reliable and rapid identification. Methods for quickly identifying new pests are often not available. Such is the case with the spotted winged fruit fly, *Drosophila suzukii* (Diptera: *Drosophilidae*). *D. suzukii* is a pest of great worldwide concern, both in countries where the fly has already established itself and in countries where it is currently absent. The target region for DNA amplification with *D. suzukii* specific primers was part of the mitochondrial cytochrome c oxidase subunit 1 (COI) gene; this is an area often used to identify species. Fly and predator DNA was amplified in an Applied Biosystems Veriti thermal cycler (USA) with 1.5 µl of DNA extract, 0.5 µm of each primer was added; Sequence alignment was performed in BioEdit along with additional sequences obtained from GenBank. Each primer pair targeting *Drosophila* sp. was hand designed and validated with Premier 5 primer (PREMIER Biosoft International, Palo Alto, USA).

We used the COI gene as a target, since it is well characterized for a number of species from the *Drosophila melanogaster* group, including sequences available for some species from the *Drosophila* species subgroup. Polymerase chain reaction (PCR) techniques have been used for decades to identify pests and diseases around the world. The results showed that these primers accurately identify the required region of the gene, which is also specific for *Drosophila* sp.

To more accurately assess the effectiveness of the primers, we tested them on other fruit fly species in the laboratory of Varamin Agrarian University, Tehran Province, Iran. The results obtained are discussed in the “results” section.

### **Sequencing and primer analysis**

In an Applied Biosystems Veriti amplifier (USA), fly and DNA (Each species of *D. suzukii*, *D. simulans* and, *D. melanogaster* separately) was amplified with 1.5 µl of DNA extract, 0.5 µm of each primer (forward and reverse), the initial denaturation stage at 95°C occurred for two minutes, followed by 35 cycles of 10 s at 95°C, 40 s at 60°C and 20 s at 72°C respectively. The final stage of elongation was carried out at 72°C for 10 min. The primers were hand-designed, which limited the size of the amplicon to <750 bp. and temperature between 55-65°C. The secondary structure of the amplicon at the primer annealing temperature was calculated using the mFold web server.

Sequencing was performed using an ABI-3500 genetic analyzer (Applied Biosystems, USA). The National Center for Biotechnology Information (NCBI) BLAST Web site (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) conducted an initial comparison of sample results with the GenBank genetic sequence database. Verification, alignment and editing of sequences were performed by BioEdit v.7.0.5. In BioEdit, the sequences were matched with additional sequences collected from GenBank. The first pair targeting *Drosophila* sp was hand developed and adopted by Primer Premier 5 (PREMIER Biosoft International, Palo Alto, USA).

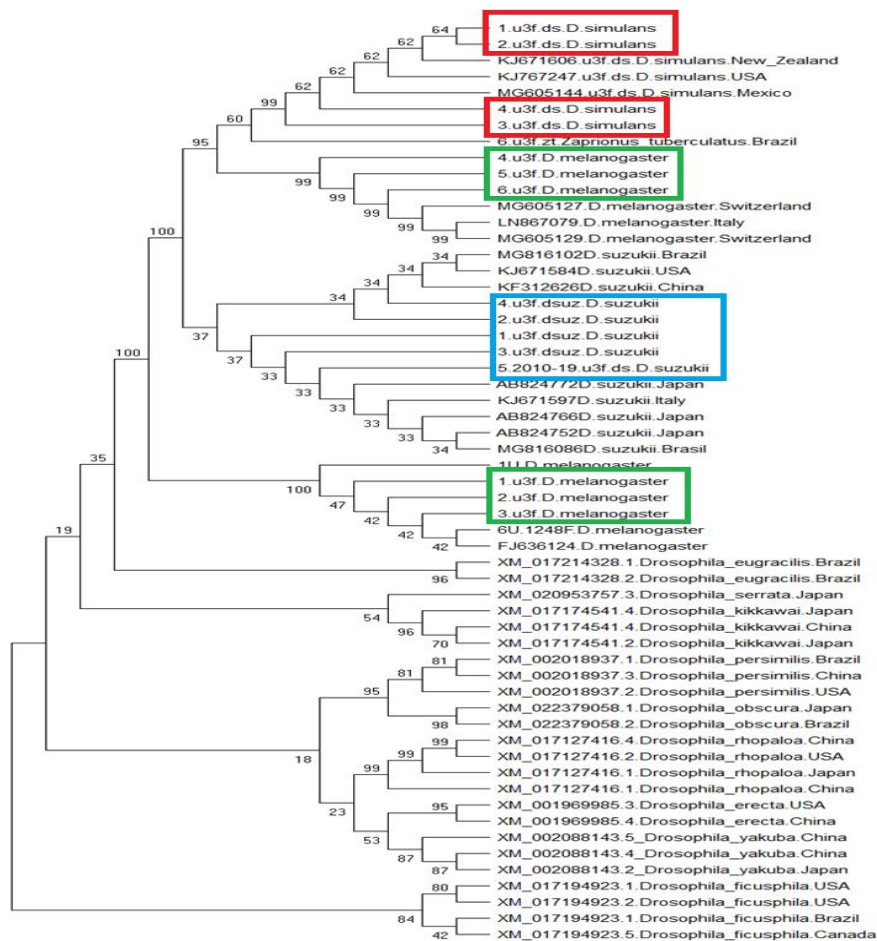
### Phylogenetic study:

**Table 1.-** List of species and accession numbers used in this research

NO	Species and Accession number	Country	Data from laboratory of Russian quarantine	Data from GenBank
1	<i>IU.D. melanogaster</i>	Turkey	✓	
2	<i>6U.1248F.D. melanogaster</i>	Egypt	✓	
3	<i>1.u3f.D. melanogaster</i>	Turkey	✓	
4	<i>2. u3f.D. melanogaster</i>	Egypt	✓	
5	<i>3. u3f.D. melanogaster</i>	Turkey	✓	
6	<i>4. u3f.D. melanogaster</i>	Turkey	✓	
7	<i>5. u3f.D. melanogaster</i>	Turkey	✓	
8	<i>6. u3f.D. melanogaster</i>	Mexico	✓	
9	<i>MG605127. D. melanogaster</i>	Switzerland		✓
10	<i>LN867079. D. melanogaster</i>	Italy		✓
11	<i>MG605129. D. melanogaster</i>	Switzerland		✓
12	<i>FJ636124. D. melanogaster</i>	Switzerland		✓
13	<i>1.u3f.ds.D. Simulans</i>	Turkey		
14	<i>2.u3f.ds.D. Simulans</i>	Iran	✓	
15	<i>3.u3f.ds.D. Simulans</i>	Turkey	✓	
16	<i>4.u3f.ds.D. Simulans</i>	Mexico	✓	
17	<i>MG605144.u3f.ds.D. Simulans</i>	Mexico	✓	
18	<i>KJ767247.u3f.ds.D. Simulans</i>	USA		✓
19	<i>KJ671606.u3f.ds.D. Simulans</i>	NewZealand		✓
20	<i>1.u3f.dsuz. D. Suzukii</i>	Canada		✓
21	<i>2.u3f.dsuz. D. Suzukii</i>	Turkey		
22	<i>1.2010-19.u3f.ds.D. Suzukii</i>	Mexico	✓	
23	<i>AB824772D.Suzukii</i>	Japan	✓	
24	<i>KJ671597D.Suzukii</i>	Italy	✓	✓
25	<i>AB824766D.Suzukii</i>	Japan		✓
26	<i>AB824752D.Suzukii</i>	Japan		✓
27	<i>KF312626D.Suzukii</i>	China		✓
28	<i>MG816102D.Suzukii</i>	unknown		✓
29	<i>MG816086D.Suzukii</i>	unknown		✓
30	<i>KJ671584D.Suzukii.</i>	USA		✓
31	<i>6.u3f.zt. ZaprionusTuberculatus</i>	Mexico		✓
32	<i>002088143.5 Drosophilayakuba.</i>	China		
33	<i>017127416.1. Drosophilahopaloa.</i>	China		✓
34	<i>002088143.2 Drosophila yakuba.</i>	Japan	✓	✓
35	<i>017127416.1. Drosophila rhopaloa</i>	Japan		✓



36	017194923.1. <i>Drosophila ficusphila</i> .	USA		✓
37	017174541.4. <i>Drosophila kikkawai</i> .	China		✓
38	001969985.3. <i>Drosophila erecta</i> .	USA		✓
39	017214328.1. <i>Drosophila eugracilis</i> .	Brazil		✓
40	022379058.1. <i>Drosophila obscura</i> .	Japan		✓
41	002018937.2. <i>Drosophila persimilis</i> .	USA		✓
42	017194923.1. <i>Drosophila ficusphila</i> .	Brazil		✓
43	017127416.1. <i>Drosophila rhopaloa</i> .	China		✓
44	017194923.2. <i>Drosophila ficusphila</i> .	USA		✓
45	017174541.2. <i>Drosophila kikkawai</i> .	Japan		✓
46	001969985.4. <i>Drosophila erecta</i> .	China		✓
47	017214328.2. <i>Drosophila eugracilis</i> .	Brazil		✓
48	022379058.2. <i>Drosophila obscura</i> .	Brazil		✓
49	002018937.1. <i>Drosophila persimilis</i> .	Brazil		✓
50	017194923.2. <i>Drosophila ficusphila</i> .	USA		✓
51	017127416.2. <i>Drosophila rhopaloa</i> .	USA		✓
52	002018937.3. <i>Drosophila persimilis</i> .	China		✓
53	017174541.4. <i>Drosophila kikkawai</i> .	Japan		✓
54	020953757.3. <i>Drosophila serrata</i> .	Japan		✓



**Fig 1.-** Molecular phylogeny of the genus *Drosophila* and closely related genera (Diptera Drosophilidae) (Red colors *D. simulans*, Green colors *D. melanogaster*, Blue colors *D. suzukii*)

The history of evolutionary processes was derived using the neighbor joining method (Adams et al.). The optimal tree is shown with the sum of branch lengths = 5.00128004. The percentage of replicated trees with associated taxa clustered together in a bootstrap test (1000 replicas) is shown next to the branches (Adams et al.). The tree is drawn to the same scale, with branch lengths in the same units as the evolutionary distances used to derive the phylogenetic tree. Evolutionary distances were calculated using the maximum composite likelihood method (Adams et al.). In addition, the data are expressed in terms of the number of base replacements per site. This analysis included 57 nucleotide sequences. The included codon positions were 1st+2nd+3rd+non-coding. All ambiguous positions were removed for each pair of sequences (pairwise removal option). There were a total of 460 positions in the final data set. An evolutionary analysis was carried out in MEGA X (Adams et al.). We used the COI gene as a target because it is well characterized for a number of species from the *Drosophila suzukii* group, including sequences available for some species from the *D. suzukii* subspecies.

*Drosophila* species are among the most widely studied organisms in biological science. Nevertheless, the unambiguous phylogenetic relationship of the subfamily Drosophilidae, which should serve as the basis for various studies using Drosophilidae, has not yet been fully established. To address this issue, we performed phylogenetic analyzes using nuclear DNA sequences for several species that had not been analyzed in previous studies. In general, the topology of our tree of 21 species agrees exactly with those presented by van der Linde et al. (2010). In the depicted phylogenetic tree, the species of *Drosophila suzukii*, *Drosophila simulans* and *Drosophila melanogaster* identified with the designed primers were placed exactly next to the species taken from the data bank. It was also established the relationship of other species of the *Drosophila* family, which have the closest genetic code.

#### **Design of specific primers for the identification of *Drosophila* sp for real-time PCR.**

Each primer (forward and reverse) was used as a probe. For PCR, 1 µl (10 pmol) of each primer, 5 µl of master-mix5dd (HS-5x), 16 µl of H<sub>2</sub>O, and 1 µl of DNA were added to the mixture. The total volume was 25 µl, the mixture was placed in a CFX 96 amplifier (Bio Rad, USA) and the real-time PCR process was started. The reaction mixture was a ready-to-use PCR mixture Screen-Mix (Evrogen, Russia). The result was obtained using the following procedure: 94°C for 5 min, then 40 cycles of 95°C for 30 s, 70°C for 20 s and 72°C for 30 s. After amplification, the melting curve was analyzed and the results were averaged (CFX Maestro software).

#### **List of primers used in this work:**

**Table 2.-** Designed primers for classical and real-time PCR

<i>NO</i>	<b>Primer name</b>	<b>Primer sequence (5' to 3')</b>	<b>Method</b>	<b>Target genes</b>	<b>Reference</b>
1	12.dsuz. F 12.dsuz.R	5'- CCTTCGTGAAGCCTTCTACCG -3' 5'- GCACTCTTGATGGGAAGATC -3'	PCR	<i>Drosophila suzukii</i>	This study
2	2. dsuz. F 2.dsuz.R	5'- TCCTGCAGAAGGGATACGGA -3' 5'- AACCACAGCGAACACCAGAA -3'	PCR	<i>Drosophila suzukii</i>	This study
3	1.dsuz F 1. dsuz R 1. dsuz Probe	5'- CCTTCGTGAAGCCTTCTACCG -3' 5'- GCACTCTTGATGGGAAGATC -3' 5'- CAACCGTTCTGGTGTTCGCTG -3'	Real-Time PCR	<i>Drosophila suzukii</i>	This study

4	7.dsuz. F 7.dsuz.R	5'- CCTTCGTGAAGCCTTCTACCG -3' 5'- GCACTCTTGATGGGAAGATC -3'	PCR	<i>Drosophila suzukii</i>	This study
5	3.dsuz F 3. dsuz R 3. dsuz Probe	5'- GGCGCCGGTGTCTGCCTGC -3' 5'- CTGGTTTGATTGTGCTGCTGC -3' 5'- GGCAATGGAACAGGGAAATTCC -3'	Real-Time PCR	<i>Drosophila suzukii</i>	This study
6	3.DM F 3.DM R 3.DM Probe	5'- GGCGCCGGTGTCTGCCTGC -3' 5'- CTGGTTTGATTGTGCTGCTGC -3' 5'- GGCAATGGAACAGGGAAATTCC -3'	Real-Time PCR	<i>Drosophila melanogaster</i>	This study
7	4.DM F 4.DM R	5'- AAGCTCTTCGGCATGGTGAT -3' 5'- CCAGTCCATAGCCCTTCTGC -3'	PCR	<i>Drosophila melanogaster</i>	This study
8	6.ds F 6.ds R	5'- CCAAGGATCGTGCTCTGTT -3' 5'- TCCACACAATCGTCTCGCAA -3'	PCR	<i>Drosophila Simulans</i>	This study
9	5.ds F 5.ds R 5.ds Probe	5'- GCAACTTCTTCATTAACCTCG -3' 5'- CTGGGGTGTGTGGGCTGATGT -3' 5'- GATAGTAGCACAGACCACCG -3'	Real-Time PCR	<i>Drosophila Simulans</i>	This study

### Chapter 3. Results and discussion.

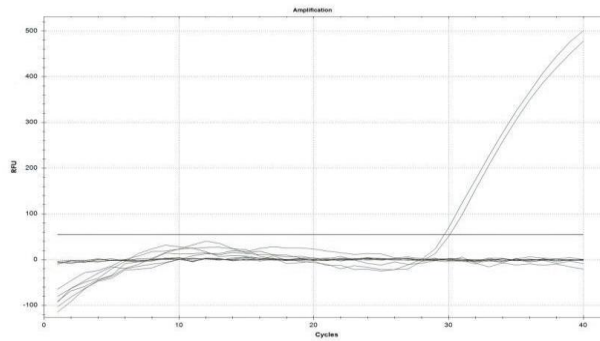
This study, we developed classical and real-time PCR assay for the detection and identification of *D. suzukii*, *D. simulans* and *D. melanogaster*. The developed primers were evaluated using several *Drosophila* sp. samples from various nations. The outcomes demonstrate the great detection selectivity. We conducted the analysis again with Iranian populations to evaluate the primers' accuracy, and the results were encouraging. For the identification, real-time and classical PCR were both used. These two approaches could be utilized, although real-time PCR is more efficient and precise. Additionally, obtaining a phorese stage is not necessary.

#### The results of Russia Federation samples:

The result of molecular diagnostics of *Drosophila suzukii* species with primers (3. Dsuz F/R. probe), real-time PCR in Russia:

**Table 3.** - The list of *Drosophila* species used in this work for the detection of *Drosophila suzukii* by real-time PCR (primer 3. Dsuz F/R. probe)

NO	Name of the species	The country: (Data from the Plant Quarantine Laboratory)	Real-time PCR result
1	<i>Drosophila suzukii</i>	Egypt	+
2	<i>Drosophila suzukii</i>	Turkey	+
3	<i>Drosophila melanogaster</i>	Russia	
4	<i>Drosophila simulans</i>	Turkey	
5	<i>Zaprionus indianus</i>	Turkey	
6	<i>Ceratitis capitata</i>	Turkey	
7	<i>Megaselia scalaris</i>	VNIKR collection	
8	<i>Bactrocera dorsalis</i>	VNIKR collection	
9	<i>Myiopardalis pardalina</i>	Turkey	
10	<i>Sarcophagi similis</i>	China	
11	<i>Zaprionus tuberculatus</i>	VNIKR collection	
12	<i>Zaprionus indianus Malloch</i>	Turkey	
13	K <sup>-</sup>	Water	-

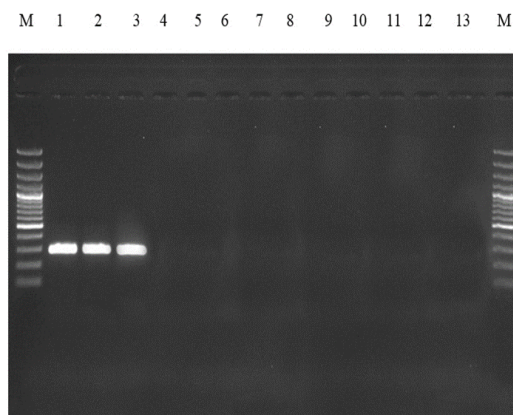


**Fig 2.-** Efficiency of real-time PCR for *D. suzukii* species (primers 3. Dsuz F/R,probe)

The developed real-time PCR primers (3. Dsuz F/R. probe) were used to diagnose 12 samples of *Drosophila* species at a temperature of 600 °C and just identified *D. suzukii* (Fig 2). The figure shows two ascending peaks that indicate a positive control with *D. suzukii* (species from Egypt and Turkey). No other peaks were observed. Of the 12 samples with unknown sequence, only 2 (samples: 1, 2) were positively identified as *D. suzukii* (positive control) due to successful amplification and the correct peak primer annealing temperature (Fig 2). No other sample showed positive amplification. The Cq values are inverse to the amount of nucleic acid that is in the samples and correlate with the number of target copies obtained in the sample. As a result, Cq values appeared in the areas of 25.19 and 26.17, and reached the highest values there. Lower Cq values (up to cycle 29) indicate a large amount of target sequence. Higher Cq values (after cycle 38) mean less target nucleic acid.

The development of more sensitive primers can be a great help to the World Quarantine Organization due to the similarity of the species to each other. All samples were identified in triplicate, one of them is given here as an example.

**The result of molecular diagnostics of *Drosophila suzukii* species with primers (7. dsuz. F/R), classical PCR in Russia:**



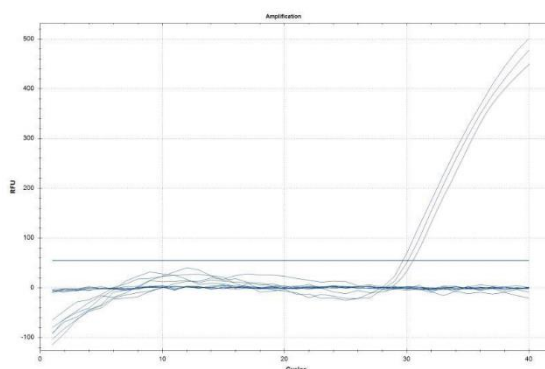
**Fig 3.-** Testing of the developed 7. dsuz. F/R primers with different amounts of *D. suzukii* DNA

The result on the gel demonstrates the selectivity of the designed primer pairs 7. dsuz. F/R. Electrophoresis image (Figure 3) sample number: 1, 2, 3: *Drosophila suzukii* from: (Mexico), (Turkey), (Egypt) 4. *Drosophila simulans*. 5. *Drosophila melanogaster*. 6. *Zaprionus indianus*, 7. *Megaselia scalaris* as a marker. M - Marker (100–1000) b.p. Negative control: DNA extraction control and amplification control.

**The result of molecular diagnostics of *Drosophila Melanogaster* species with primers (3.dm. F/R. probe), real-time PCR in Russia:**

**Table 4.** - The list of *Drosophila* species used in this work for the detection of *Drosophila melanogaster* by real-time PCR (primers 3.dm. F/R. probe)

NO	Name of the species	Country: (Data from Plant Quarantine Laboratory)	Result
1	<i>Drosophila melanogaster</i>	Turkey	+
2	<i>Drosophila suzukii</i>	Egypt	
3	<i>Drosophila simulans</i>	Russia	
4	<i>Zaprionus indianus</i>	Canada	
5	<i>Ceratitis capitata</i>	Turkey	
6	<i>Megaselia scalaris</i>	Turkey	
7	<i>Bactrocera dorsalis</i>	VNIKR collection	
8	<i>Myiopardalis pardalina</i>	VNIKR collection	
9	<i>Drosophila melanogaster</i>	Egypt	+
10	<i>Sarcophagi similis</i>	China	
11	<i>Zaprionus tuberculatus</i>	VNIKR collection	
12	<i>Drosophila funebris</i>	Turkey	
13	<i>Drosophila melanogaster</i> (54/89861)	Iran	+
14	K <sup>-</sup>	Water	-

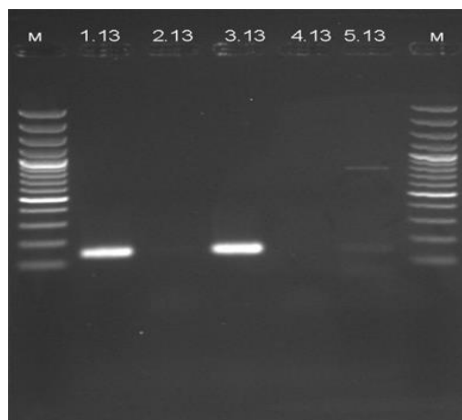


**Fig 4.-** Efficiency of the real-time PCR method in the identification of the *Drosophila melanogaster* species (primers 3.dm. F/R probe)

In these results, we have 14 samples for identification with the designed primer (primers 3.dm. F/R. Probe) and Temperature: 59.4 °C, 3 samples of *Drosophila melanogaster* as a passive control, 10 samples from sub-species whose names are listed in (Table 4) (Fig 4). In addition, there is a case of a negative control (sample 14). Two specimens were positively identified as *Drosophila melanogaster*; samples (1,

9 and 13) showed annealing peaks in the acceptable range of Temperature:59.04 °C and were clearly separated from other species. No other peaks were observed.

**The result of molecular diagnostics of *Drosophila Melanogaster* species with primers (4.DM. F/R), classical PCR in Russia:**



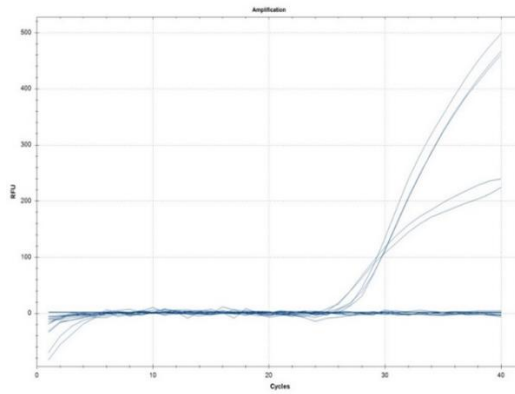
**Fig 5.-** Testing of the developed 4.DM. F/R primers with different amounts of *D. melanogaster* DNA

The result on the gel demonstrates the selectivity of the designed primer pairs (4.DM. F/R) for classical PCR. Sample number: 1.13. *Drosophila melanogaster*. From Turkey. 2.13. *Drosophila simulans* samples from Russia. 3.13. *Drosophila melanogaster* from Egypt. 4.13. *Drosophila suzukii* from Turkey. 5.13. K-. Negative controls include DNA extraction and amplification. M: DNA marker (100-1000) bp.

**The result of molecular diagnostics of *Drosophila simulans* species with primers (5.ds. F/R. probe), real-time PCR in Russia:**

**Table 5.-** List of *Drosophila* species used in this paper, which were used to determine *Drosophila simulans* by real-time PCR (primers 5.ds.F/R. probe)

NO	Name of the species	Country: (Data from Plant Quarantine Laboratory)	Result
1	<i>Drosophila simulans</i>	Turkey	+
2	<i>Drosophila suzukii</i>	Egypt	
3	<i>Drosophila melanogaster</i>	Russia	
4	<i>Zaprionus indianus</i>	Canada	
5	<i>Ceratitis capitata</i>	Turkey	
6	<i>Megaselia scalaris</i>	Turkey	
7	<i>Bactrocera dorsalis</i>	unknown	
8	<i>Myiopardalis pardalina</i>	Mexico	
9	<i>Sarcophagi similis</i>	Turkey	
10	<i>Zaprionus tuberculatus</i>	China	
11	<i>Drosophila funebris</i>	unknown	
12	<i>Drosophila simulans</i> (ds/2)	Russia	+
13	<i>Drosophila simulans</i>	Russia	+
14	K <sup>-</sup>	Water	-



**Fig 6.-** Efficiency of real-time PCR for the identification of *D. simulans* (primers 5.ds.F/R. probe)

The figure shows five ascending peaks that indicate a positive control for *D. simulans*. *Zaprionus indianus* and *Megaselia scalaris* were used as markers. No other peaks were observed. In the graph, the peaks of the two *D. simulans* samples are different, since both types of DNA isolated from simulans differed in quality, detection area, and quantity.

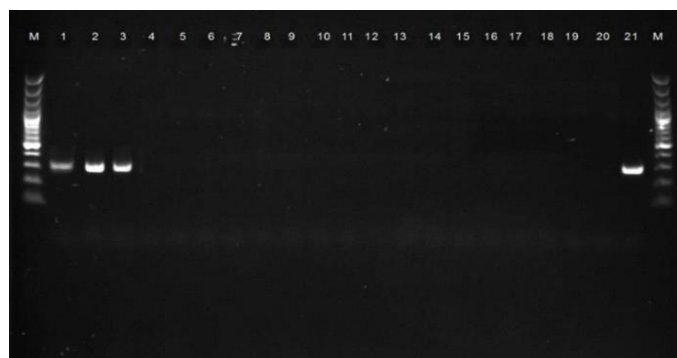
Of the 10 samples (Table 5), three were *D. simulans* (positive control) and the rest were inconclusive.  $Cq \leq 29$  is observed in all *D. simulans* accessions.

In Table 5, out of 13 unknown samples, only 3 (1, 12, and 13) were positively identified as *Drosophila simulans* (positive control) due to successful amplification and correct maximum annealing temperature. The best of them was sample number (1). No other sample showed such successful amplification.

The importance of the primers we have developed is that it is extremely difficult to identify these pests at the larval stage, because they are very similar to each other, and other more accurate methods must be used.

In general, according to the studies carried out and the phylogenetic tree created, *Drosophila simulans* is one of the related species of *Drosophila suzukii* and has a very close genetic code to *Drosophila suzukii*; it is also included in the list of quarantine objects in many countries (including Canada, Poland, etc.). It is recommended to include this species of fruit fly also in the Russian list of quarantine objects.

**The result of molecular diagnostics of *Drosophila simulans* species with primers (6.ds. F/R), classical PCR in Russia:**



**Fig 7.-** Testing of the developed 6.ds.F/R primers with different amounts of *D. simulans* DNA

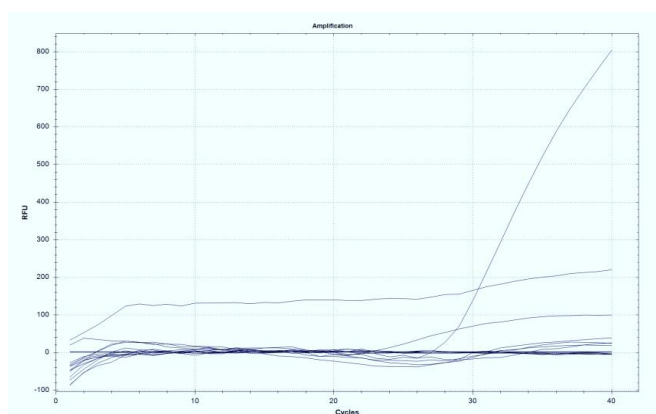
The result on the gel demonstrates the selectivity of the designed primer pairs 6.ds.F/R. 1, 2, 3: *Drosophila simulans*. 4-11: *Drosophila suzukii*. 12-15: *Drosophila melanogaster*, 16, 17: *Zaprionus indianus*. *Megaselia scalaris* :18, 19. K<sup>-</sup>: 20: negative control (dH<sub>2</sub>O); K<sup>+</sup>: 21(*Drosophila simulans*). M: DNA marker (100-1000) bp.

**The results of Iran samples:**

**Table 6.** - List of *Drosophila* species used in this paper, which were used to determine *Drosophila suzukii* by real-time PCR with a sample in Iran (1. dsuz. F/R. probe)

№	Name samples	Country (data from VNIKR)	Real-time PCR results
1	<i>Drosophila suzukii</i>	Iran	+
2	<i>Drosophila suzukii</i>	Iran	+
3	<i>Drosophila funebris</i>	Turkey	
4	<i>Drosophila suzukii</i>	Iran	+
5	<i>Drosophila melanogaster</i>	Turkey	
6	<i>Drosophila simulans</i>	Russia	
7	<i>Zaprionus indianus</i>	Jordan	
8	<i>Ceratitis capitata</i>	Turkey	
9	<i>Megaselia scalaris</i>	Iran	
10	<i>Bactrocera dorsalis</i>	Iran	
11	<i>Myiopardalis pardalina</i>	Turkey	
12	<i>Zaprionus tuberculatus</i>	Turkey	
13	<i>Zaprionus indianus Malloch</i>	Turkey	
14	K <sup>-</sup>	Water	-

**Result of a real-time PCR on *Drosophila suzukii* with all fruit fly species in Iran (Primer 1. dsuz. F/R. probe):**

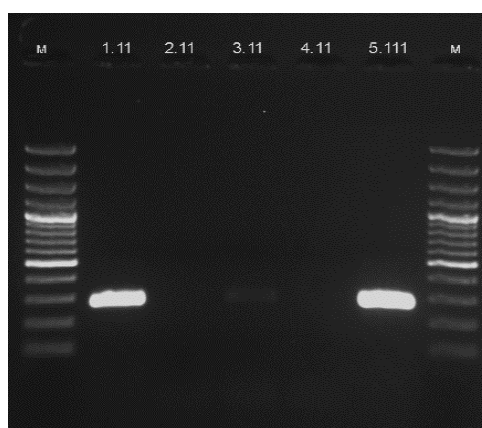


**Fig 8.** - Efficiency of real-time PCR for the identification of *D. suzukii* (primers 1. dsuz. F/R probe)

In these results, we have 13 samples for identification with the designed primer (Primer 1. dsuz. F/R probe) and Temperature: 60.08°C, 3 samples of *D. suzukii* (from Iran). Of the 13 samples with another sub-species, only 3 (samples: 1, 2, 4) were positively identified as *D. suzukii* (positive control) due to successful amplification and the correct peak primer annealing temperature (Fig 8). There is no information about other melting peaks.



**Result of a classical PCR on *Drosophila suzukii* with all fruit fly species in Iran (primer 7. dsuz. F/R):**



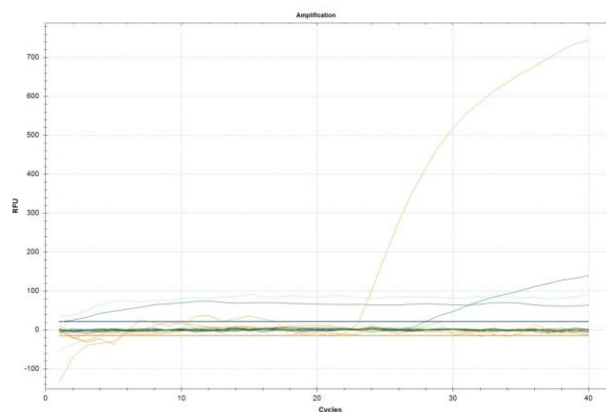
**Fig 9.-** Testing of the developed primer 7. dsuz. F/R with different amounts of *D suzukii* DNA

The result on the gel demonstrates the selectivity of the designed primer pairs (4.DM. F/R) for classical PCR. Sample number: 1.11. *Drosophila suzukii*, from Iran. 2.11. *Drosophila simulans* samples from Turkey. 3.11. *Specimens of Drosophila melanogaster* from Egypt. 4.11. K-. 5.11. K+. *Specimens of Drosophila suzukii* from Iran. Negative controls include DNA extraction and amplification. M: DNA marker (100-1000) bp

**Result of a real-time PCR on *Drosophila melanogaster* with all fruit fly species in Iran (primer 3.dm. F/R. probe):**

**Table 7. -** List of *Drosophila* species used in this paper, which were used to determine *Drosophila melanogaster* by real-time PCR with a sample in Iran (primer 3.dm. F/R. probe)

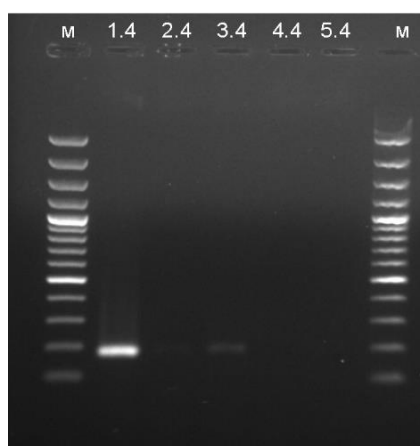
Nº	Name samples	Country (data from VNIKR)	Real-time PCR results
1	<i>Drosophila melanogaster</i>	Iran	+
2	<i>Drosophila melanogaster</i>	Iran	+
3	<i>Drosophila suzukii</i>	Turkey	
4	<i>Drosophila funebris</i>	Iran	
5	<i>Drosophila melanogaster</i>	Turkey	
6	<i>Drosophila simulans</i>	Russia	
7	<i>Zaprionus indianus</i>	Jordan	
8	<i>Ceratitis capitata</i>	Turkey	
9	<i>Megaselia scalaris</i>	Iran	
10	<i>Bactrocera dorsalis</i>	Iran	
11	<i>Myiopardalis pardalina</i>	Turkey	
12	<i>Zaprionus tuberculatus</i>	Turkey	
13	<i>Zaprionus indianus Malloch</i>	Turkey	
14	K <sup>-</sup>	Water	-



**Fig 10.** - Efficiency of real-time PCR for the identification of *Drosophila melanogaster* in Iran (primers 3.dm. F/R. probe)

In these results, we have 13 samples for identification with the designed primer (primers 3.dm.F/R.probe) and temperature: 59.4 °C, two samples of *Drosophila melanogaster*, 11 samples from sub-species whose names are listed in Table 7 (Fig 10). In addition, there is a case of a negative control (sample 14). Two specimens were positively identified as *Drosophila melanogaster*; samples (1, 2) showed annealing peaks and were clearly separated from other species. No other peaks were observed.

**Result of a classical PCR on *Drosophila melanogaster* with all fruit fly species in Iran (primer 4. DM. F/R):**



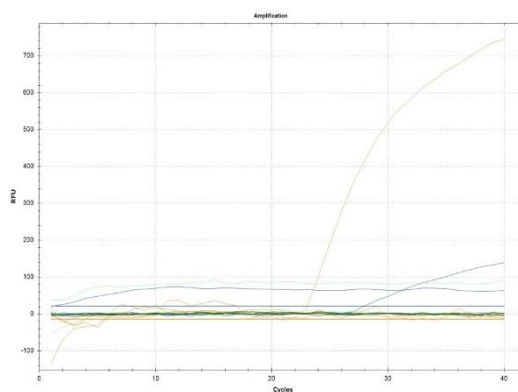
**Fig 11.-** Testing of the developed primer 4. DM. F/R with different amounts of *D. melanogaster* DNA

The result on the gel demonstrates the selectivity of the designed primer pairs (4.DM. F/R) for classical PCR. Sample number: 1.4. *Drosophila melanogaster*, from Iran. 2.4. *Drosophila simulans* samples from Turkey. 3.4. *Drosophila melanogaster* from Turkey. 4.4. *Drosophila suzukii* from Iran. 5.4. K<sup>-</sup>. Negative controls include DNA extraction and amplification. M: DNA marker (100-1000) bp.

**Result of a real-time PCR on *Drosophila simulans* with all fruit fly species in Iran (5.ds. F/R. probe):**

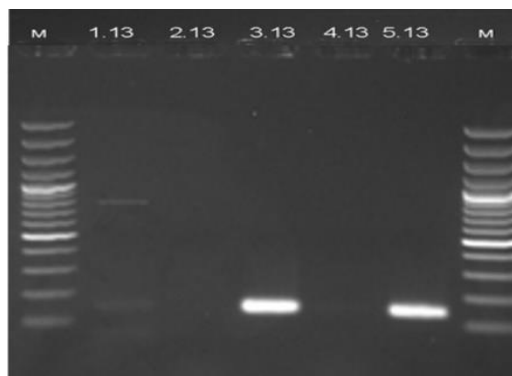
**Table 8.** - The list of *Drosophila* species used in this work for the identification of *Drosophila simulans* by real-time PCR (primer 5.ds.F/R. probe)

NO	Name of the species	Country: (Data from Plant Quarantine Laboratory)	Result
1	<i>Drosophila simulans</i>	Iran	+
2	<i>Drosophila simulans</i>	Iran	+
3	<i>Drosophila melanogaster</i>	Russia	
4	<i>Zaprionus indianus</i>	Canada	
5	<i>Drosophila simulans</i>	Iran	+
6	<i>Ceratitis capitata</i>	Turkey	
7	<i>Megaselia scalaris</i>	unknown	
8	<i>Bactrocera dorsalis</i>	Turkey	
9	<i>Myiopardalis pardalina</i>	Turkey	
10	<i>Sarcophagi similis</i>	China	
11	<i>Zaprionus tuberculatus</i>	unknown	
12	<i>Drosophila funebris</i>	Russia	
13	<i>Drosophila suzukii</i>	Iran	
14	K <sup>-</sup>	Water	-



**Fig 12.** - Efficiency of real-time PCR with all fruit fly species in Iran for the identification of *D. simulans* (primer 5.ds. F/R. probe)

In Table 8, out of 13 samples, three of them (number of samples: 1, 2, 5) were positively identified as *Drosophila simulans* from Iran due to successful amplification and correct maximum annealing temperature (Figure 12). The best of them was sample number (1). No other sample showed such successful amplification.



**Fig 13.-** Testing of the developed 6.ds.F/R primers with different amounts of *D. simulans* DNA

The result on the gel demonstrates the selectivity of the designed primer pairs (6.ds. F/R) for classical PCR. Sample number: 1.13. *Drosophila melanogaster*, from Turkey. 2.13. *Drosophila suzukii* samples from Russia. 3.13. *Drosophila simulans* samples from Iran. 4.13. K<sup>-</sup>. 5.13. K<sup>+</sup>. Specimens of *Drosophila simulans* from Iran. Negative controls include DNA extraction and amplification. M: DNA marker (100-1000) bp.

## CONCLUSIONS

Based on the study, the following conclusions can be drawn:

- For the identification of *Drosophila suzukii*, *Drosophila simulans* and *Drosophila melanogaster*, nine primers were designed: 5 primers for conventional PCR and 4 primers for real-time PCR with extremely high identification accuracy. Primers can accurately define the gene regions of the studied species by isolating them from several closely related *Drosophila* sp. some of which are on the list of quarantine objects.
- According to the phylogenetic tree, 3 species of *Drosophila suzukii*, *Drosophila simulans* and *Drosophila melanogaster*, each fell into a separate clade, the constructed phylogenetic tree also shows that primers designed with maximum accuracy identified each *Drosophila* species among its subspecies.
- The design of the primers included temperature optimization, and after three iterations of testing each sample, the optimal temperature for their use was selected.
- Almost all developed primers were also tested in the Quarantine Organization of Iran. The results of their sensitivity and accuracy were similar to those of Russia and approved for use by the Iranian quarantine service. However, the primer pair 12. primers dsuz F/R for classical PCR and 1.dsuz.F/R., developed for real-time PCR for the identification of *Drosophila suzukii*, did not show high accuracy and quality of identification in Iran.
- According to research and a phylogenetic tree created, *Drosophila simulans* is one of the related species of *Drosophila suzukii* and has a genetic code very close to *Drosophila melanogaster*. It is also included in the list of quarantine objects in many countries (including Canada, Poland, etc.). It is recommended that the fruit fly species *Drosophila simulans* be included in the list of quarantine objects in Russia.

**The list of references.** Include 84 titles: directories and regulatory documents, dissertations and abstracts, books and articles in English, online and offline resources.

### List of works published by the author on the topic of the dissertation:

#### *Articles in publications indexed by Scopus and Web of Science*

1. **Naserzadeh Y.**, Mahmoudi N., Pakina E., Zargar M. Molecular identification and primer design for spotted wing drosophila (*Drosophila suzukii*) // Research on Crops. – 2020. – T. 21, № 2. – C. 364-369.
2. **Naserzadeh Y.**, Bondarenko G., Kolesnikova E., Zargar M., Pakina E., Engeribo A. Molecular identification and design of specific primer for quarantine fruit fly (*Drosophila suzukii*) // Research on Crops. – 2020. – T. 21, № 3.

#### *Articles in publications indexed by international journal*

1. **Naserzadeh Y.**, Mahmoudi N., Gonzalez Cabrera J, Engeribo A. Molecular Identification, Biological and Reproductive Characteristics of *Drosophila Suzukii* Developed in Six Host Plants of Economic Importance in Iran// Agri Res & Tech: Open Access J– 2021 T. 26 , № 2. 556332

2. **Naserzadeh Y.**, Mahmoudi N., Pakina E. Biological and Reproductive Characteristics of the Mediterranean Fruit Fly, *Ceratitis capitata* (Dip.: Tephritidae), on Six Host Plants Under Vitro Conditions // reproduction –2020 – Т.12, № 14. – С. 15.

*Articles in publications from the BAK list*

1. **Naserzadeh Y.**, Pakina E. N., Nafchi A. M., Gadzhikurbanov A. S. Specific Identification Method based on PCR for *Drosophila melanogaster* // Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Агрономия и животноводство. – 2020. – Т. 15, № 2. – С. 134-141.
2. **Naserzadeh Y.**, Bondarenko G. N., Kolesnikova E. V., Pakina E. N. Phylogenetic analysis and designing new primers for molecular identification of *Drosophila suzukii* // RUDN Journal of Agronomy and Animal Industries. – 2021. – Т. 16, № 2. – С. 137-145.

*Articles in publications from the scientific conferences*

1. **Naserzadeh Y.**, Mahmoudi N., Pakina E. SPECIFIC IDENTIFICATION METHOD FOR *DROSOPHILA MELANOGASTER* // НАУКА И ИННОВАЦИИ-СОВРЕМЕННЫЕ КОНЦЕПЦИИ (Moscow, May 22, 2020). / resp. ed. D.R. Khismatullin. – Moscow: Infiniti Publishing House –, 2020.May – С. 155-161. ISBN 978-5-905695-43-8

**ABSTRACT**  
**MOLECULAR IDENTIFICATION AND DESIGN OF SPECIFIC PRIMERS FOR  
QUARANTINE AND NON-QUARANTINE FRUIT FLY SPECIES (*DROSOPHILA  
SUZUKII*, *DROSOPHILA SIMULANS*, *DROSOPHILA MELONOGASTER*)**

The *Drosophilidae* family includes over 3,750 species worldwide, and over 2,000 of them are *Drosophila* species. The spotted-winged fruit fly (SWD), *Drosophila suzukii*, is one of the most dangerous species of this family. Insects live in intact ripening fruits, laying eggs in them. The aim of this study was to develop and test a simple and economical PCR assay, as well as to develop specific primer pairs for pest identification by real-time PCR and classical PCR, which allow the most accurate detection of *Drosophila* sp. Accurate control and identification is very important when organizing quarantine measures. According to our research among articles and research by scientists, as well as a search on official websites for quarantine and non-quarantine pests, there is currently no complete analysis of *Drosophila suzukii* in Russia. However, we consider this project as a search for a way to quickly identify and distinguish between the species of these dangerous fruit flies, including quarantine objects (*Drosophila suzukii*, *Drosophila simulans*, *Drosophila melanogaster*), since Russia imports and exports fruits and vegetables in huge volumes, which requires more stringent control and new ways to quickly detect and eliminate this threat.

**АННОТАЦИЯ**

**МОЛЕКУЛЯРНАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ И ДИЗАЙН СПЕЦИФИЧЕСКИХ ПРАЙМЕРОВ  
ДЛЯ КАРАНТИННЫХ И НЕКАРАНТИННЫХ ВИДОВ ПЛОДОВЫХ МУШЕК  
(*DROSOPHILA SUZUKII*, *DROSOPHILA SIMULANS*, *DROSOPHILA MELONOGASTER*)**

Семейство *Drosophilidae* включает более 3750 видов по всему миру, и более 2000 из них являются видами *Drosophila*. Пятнистокрылая дрозофила (SWD), *Drosophila suzukii* — один из самых опасных видов этого семейства. Насекомые живут в неповрежденных созревающих плодах, откладывая в них яйца. Целью данного исследования было разработать и протестировать простой и экономичный ПЦР-анализ, а также разработать специфические пары праймеров для идентификации вредителей методом ПЦР в реальном времени и классической ПЦР, которые позволяют наиболее точно обнаруживать *Drosophila* sp. Точный контроль и идентификация очень важны при организации карантинных мероприятий. Согласно нашим исследованиям среди статей и исследованиям ученых, а также поиску на официальных сайтах карантинных и некарантинных вредителей, в настоящее время полноценного анализа *Drosophila suzukii* в России нет. Однако данный проект мы рассматриваем как поиск способа быстрого выявления и разграничения вида этих опасных плодовых мушек, включая карантинные объекты (*Drosophila suzukii*, *Drosophila simulans*, *Drosophila melanogaster*), так как Россия импортирует и экспортирует фрукты и овощи в огромных объемах, что требует более жесткого контроля и новых способов быстрого обнаружения и устранения этой угрозы.

*На правах рукописи*

**НАСЕРЗАДЕ ЮСЕФ**

**МОЛЕКУЛЯРНАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ И ДИЗАЙН СПЕЦИФИЧЕСКИХ ПРАЙМЕРОВ  
ДЛЯ КАРАНТИННЫХ И НЕКАРАНТИННЫХ ВИДОВ ПЛОДОВЫХ МУШЕК  
(*DROSOPHILA SUZUKII*, *DROSOPHILA SIMULANS* И *DROSOPHILA MELONOGASTER*)**

Специальности 4.1.3 Агрехимия, агропчвоведение, защита и карантин растений

**АВТОРЕФЕРАТ**

Диссертация на соискание учёной степени  
кандидата биологических наук

Москва – 2022

Работа выполнена в агробиотехнологическом департаменте Аграрно-технологического института ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» (АТИ РУДН)

**Научный руководитель:**

доктор сельскохозяйственных наук,  
Доцент Агробиотехнологического департамента  
АТИ РУДН

**Пакина Елена Николаевна,**

**Официальные оппоненты:**

Доктор сельскохозяйственных наук,  
заведующий кафедрой «Защита растений и плодовоовощеводство»  
ФГБОУ ВО Вавиловский университет

**Еськов Иван Дмитриевич**

кандидату биологических наук,  
начальник отдела карантина растений  
ФГБУ «Северо- Кавказская  
межрегиональная ветеринарная лаборатория»

**Пименов Сергей Викторович**

**Ведущая организация:**

ФГАОУ ВО «Крымский Федеральный Университет им. В.И. Вернадского»

Защита диссертации состоится «26» Декабря 2022 г. в 12-00 часов на заседании диссертационного совета ПДС 2021.002 при ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» (РУДН) по адресу: 117198, ул. Миклухо-Маклая, д.8, корп.2 в аудитории 423.

Защита диссертации состоится «26» декабря 2022 г. в 12-00 часов на заседании диссертационного совета ПДС 2021.002 при ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» (РУДН) по адресу: 117198, ул. Миклухо-Маклая, д.8, корп.2 в аудитории 423.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке в УНИБЦ (Научной библиотеке) ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» (РУДН) по адресу: 117198, ул. Миклухо-Маклая, д.6. и на сайте <https://www.rudn.ru/science/dissovet>

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 2022 г.

Учёный секретарь  
диссертационного совета ПДС 2021.002  
кандидат сельскохозяйственных наук

**Введенский Валентин Валентинович.**



## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность исследования.** Дрозофила или плодовая муха – мелкое насекомое, среда обитания которого в основном связана с перезревшими или гниющими фруктами и овощами. Известно около 1500 видов рода *Drosophila*. Мухи *Drosophila* sp. иногда их называют маленькими плодовыми мушками, настоящие плодовые мушки принадлежат к семейству Tephritidae. Они не только крупнее, но и являются широко распространенными вредителями сельскохозяйственных культур. Подавляющее большинство плодовых мух в своем жизненном цикле связано с гнилыми или перезревшими фруктами и относятся к разряду опасных вредителей. Однако некоторые виды, такие как пятнистая крылатая плодовая муха *Drosophila suzukii* (Matsuura), могут заражать не только перезревшие, но и незрелые плоды и имеют особое экономическое значение. У этого вида высокая репродуктивная способность и короткое время генерации; теоретически *D. suzukii* может иметь до 13 поколений в год, что может способствовать быстрому распространению при наличии подходящих растений-хозяев. Чрезвычайно широкий круг хозяев (более 30 видов плодовых культур) и высокий потенциал расселения делают инвазию *D. suzukii* серьезным источником экономического ущерба.

*D. melanogaster* - инвазивный сельскохозяйственный вредитель мелких косточковых плодов, произрастающих в Азии. В 2008 году он был впервые обнаружен в Калифорнии, Испании и Италии; сегодня этот вид обитает на большей части территории Северной Америки и Европы, а также был обнаружен в Южной Америке.

*Drosophila simulans* — вид мух, тесно связанный с *D. melanogaster* и принадлежащий к той же подгруппе видов. Согласно исследованиям, Альфред Стертевант открыл генетику мух в 1919 году, когда заметил, что мухи *D. melanogaster* и *D. simulans*, использовавшиеся в лаборатории Колумбийского университета Томаса Ханта Моргана, на самом деле были двумя разными видами. В настоящее время в Европе почти не осталось стран, где бы не были обнаружены представители *Drosophila simulans*. Вид *Drosophila simulans* пока не включен в российский список карантинных объектов, но, тот факт, что он чрезвычайно близок к *D. melanogaster* и *D. suzukii* создает предпосылки для его потенциального расселения на территории РФ. поэтому данный вид наряду с другими представителями рода *Drosophila* был исследован в рамках данного проекта.

Неполовозрелые стадии развития *D. suzukii* крайне трудно отличить от других дрозофил, что создает проблемы для исследований и соблюдения карантинных ограничений, направленных на предотвращение распространения этого вредителя при экспорте фруктов. Этот вид происходит из Восточной Азии и недавно распространился в Европу, Северную и Южную Америку. С 2011 г. *D. suzukii* включен в список ЕОКЗР А2 (ЕОКЗР 2020). Его присутствие было зарегистрировано как минимум в 20 европейских странах. В 2014 г. *D. suzukii* впервые отмечен на Черноморском побережье Крыма. Однако больше нигде в России *D. suzukii* не регистрировался.. В связи с этим актуальной проблемой является разработка быстрых и точных молекулярных тест-систем для идентификации опасных видов плодовых мушек *Drosophila* sp., таких как *D. suzukii*, *D. simulans*, *D. melanogaster*. В данном исследовании мы разработали высокоспецифичный и высокочувствительный вариант ПЦР в реальном времени для точной идентификации видов *Drosophila* sp.

**Степень разработанности темы.** Большая часть *Drosophila* sp. находящиеся в импортной продукции или обнаруженные при обследовании садов, находятся на личиночной стадии. Как известно, почти невозможно точно идентифицировать вредителя на стадии личинки, поэтому для

точной идентификации требуется время, чтобы из личинок развились взрослые особи (имаго). При исследовании подкарантинной продукции длительный период ожидания при прохождении всех стадий метаморфоза вредителем для его точной идентификации неприемлим, поскольку собранные фрукты при долгом простое могут быстро испортиться, что приведет к серьезным финансовым потерям. В такой ситуации решение лежит в плоскости создания точных и высокоэффективных методов молекулярной диагностики

Классические методы идентификации плодовых мушек основаны на морфологических и анатомических различиях с использованием микроскопического анализа изображений. Морфологическая идентификация является одним из более дешевых методов определения видовой принадлежности, помогает сопоставить морфологию с возможной функцией насекомого и является важным инструментом для морфологов. При этом данный метод не подходит для некоторых видов дрозофилы, таких как *D.simulans*, которые имеют много общего с другими видами, поэтому их морфологически трудно различить. Таким образом, идентификация видов плодовых мух с высоким уровнем достоверности только на основе морфологии может быть затруднена, а точная идентификация требует интеграции данных о таких параметрах как последовательности ДНК. Для идентификации насекомых и плодовых мушек было разработано множество методов на основе ДНК-тестов.

Одним из широко распространенных методов диагностики является использование ПЦР. Существует несколько универсальных праймеров для этого метода, которые можно использовать для общей идентификации *Drosophila* sp. Однако универсальность праймеров не дает достоверных результатов в идентификации отдельных видов р. *Drosophila* sp., среди которых ряд видов являются карантинными объектами. Специфическая амплификация мишени требует, чтобы праймеры не совпадали с другими мишенями в определенных направлениях и на определенных расстояниях, что допускает нежелательную амплификацию. Поэтому в этом исследовании было разработано и изготовлено более 9 пар новых праймеров для повышения селективности и чувствительности анализа видов *D.suzukii*, *D.simulans* и *D.melanogaster*.

**Цель** настоящего исследования состоит в том, на сегодняшний день в России при большом объеме импорта и экспорта фруктов и овощей отсутствует полноценный анализ *Drosophila suzukii*, включая методы точной диагностики, целью настоящего исследования был поиск способа быстрого выявления данного вида опасных плодовых мушек, а также усовершенствование методов идентификации близкородственных видов *Drosophila simulans* и *Drosophila melanogaster*,

Для достижения указанной цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Разработка точных и чувствительных праймеров для ПЦР в реальном времени и классической ПЦР для обнаружения не карантинных вредителей *Drosophila melanogaster*.
2. Разработка точных и чувствительных праймера для ПЦР в реальном времени и классической ПЦР для обнаружения не карантинных вредителей *Drosophila simulans*.
3. Разработка точных и чувствительных праймеров для ПЦР в реальном времени и классической ПЦР для обнаружения карантинных вредителей *Drosophila suzukii*.
4. Оптимизация разработанных праймеров на разных видах плодовых мушек, генетически тесно связанных друг с другом.
5. Проверка селективности праймеров с разными видами в качестве маркера.
6. Изучение разработанных праймеров для оценки и анализа их эффективности в специализированных лабораториях Ирана и России.

В данной работе для начального изучения и обзора научной литературы использовались теоретические методы. Большая часть проекта является практической и выполняется в лаборатории, а затем тщательно изучается с помощью различных программных методов.

#### **Объектом исследования.**

Поскольку на сегодняшний день в России при большом объеме импорта и экспорта плодоовощной продукции отсутствует полноценный анализ *Drosophila suzukii*, в том числе точные методы диагностики, целью настоящего исследования было найти способ быстрого выявления этого вида опасных плодовых мушек, а также усовершенствовать методы выявления близкородственных видов *Drosophila simulans* и *Drosophila melanogaster*.

#### **Предметом исследования.**

Собран и проанализирован полученный материал, обработаны и интерпретированы данные. Новые учебники, разработанные для идентификации карантинных и некарантинных видов плодовых мух в период с 2018 по 2022 г).

**Научная новизна.** В рамках диссертационных исследований впервые:

- Проведен филогенетический анализ видов *Drosophila* sp совместно с другими близкими видами в качестве маркера.
- Разработаны праймеры, которые точно идентифицируют нужные генетические области у видов *Drosophila suzukii*, *Drosophila simulans*, *Drosophila melanogaster* , а также праймеры с использованием маркеров для подтверждения их точности для ПЦР в реальном времени и классической ПЦР
- Проведена масштабная молекулярная идентификация с точным разграничением видовой принадлежности для определения карантинных и некарантинных объектов *D.suzukii*, *D.simulans*, *D. melanogaster* во Всероссийском центре карантина растений (ВНИИКР).
- Проведена молекулярная идентификация с точным разграничением видовой принадлежности для определения плодовых мух *D.suzukii*, *D.simulans*, *D. melanogaster* в Иране.
- Созданные праймеры используются для оценки эффективности существующих методов диагностики в специализированных лабораториях Ирана.

**Теоретическая значимость исследования.** Теоретическая и практическая значимость заключается в разработке новых специфичных праймеров для экспресс-диагностики карантинных и некарантинных видов *Drosophila* sp.

Для молекулярной идентификации *D.suzukii*, разработаны три пары праймеров - 12.dsuz.F/R, 12.dsuz.F/R и 3.dsuz.F/R для классической ПЦР и 1.dsuz.F/R. Probe и 3. dsuz. F/R. А также для ПЦР в реальном времени.

Для молекулярной идентификации *D. melanogaster* были разработаны две пары праймеров - 4. DM. F/R для классической ПЦР и 3. DM. F / R. Probe для ПЦР в реальном времени. Для молекулярной идентификации *D.simulans* были разработаны две пары праймеров - 6.ds. F/R для классической ПЦР и ds.F/R.Probe для ПЦР в реальном времени.

**Методология и методы исследования.** Выделение ДНК из исследуемого материала (насекомые и личинки) проводили путем обработки образцов протеиназой К с последующим удалением белка без экстракции органическими растворителями с использованием набора ДНК Экстран-2, номер набора НГ-511-100 (Синтол). , Российская Федерация) в соответствии с

инструкциями производителя. Экстракты ДНК измеряли на спектрофотометре NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific Inc., США). Исследовали образцы личинок, куколок и выделенную ДНК.

Секвенирование проводили на генетическом анализаторе ABI-3500 (Applied Biosystems, США). Веб-сайт Национального центра биотехнологической информации (NCBI) BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) провел первоначальное сравнение результатов образцов с базой данных генетических последовательностей GenBank. Последовательности были проверены, выровнены и отредактированы с помощью BioEdit v.7.0.5.3. В BioEdit последовательности были сопоставлены с дополнительными последовательностями, собранными из GenBank. Первый праймер, нацеленный на *Drosophila* sp, был разработан и использован компанией Primer Premier 5 (PREMIER Biosoft International, Пало-Альто, США).

Чтобы более точно оценить эффективность праймеров, мы протестировали их на других видах плодовых мух в лаборатории Сельскохозяйственного университета Варамин, провинция Тегеран. Полученные результаты обсуждаются в разделе «Результаты».

#### **Положения, выносимые на защиту:**

- Валидация и усовершенствование методов молекулярной видоспецифичной диагностики *D. suzukii*, *D. simulans* и *D. melanogaster* с использованием *Drosophila* sp. ДНК исследуемых популяций.
- Воспроизводимость и точность результатов, полученных с помощью разработанных праймеров.
- Селективность созданных праймеров среди сходных видов.
- Производительность разработанных праймеров, сравнительный анализ классической ПЦР и ПЦР в реальном времени.

**Степень достоверности и апробации результатов.** Результаты, полученные в рамках диссертации, были представлены под названием: КОНКРЕТНЫЙ МЕТОД ИДЕНТИФИКАЦИИ DROSOPHILA MELANOGASTER и обсуждены на конференции НАУКА И ИННОВАЦИИ-СОВРЕМЕННЫЕ КОНЦЕПЦИИ (Москва, 22 мая 2020 г.).

**Личный вклад автора диссертации.** Заявитель участвовал в постановке цели и задач исследования; собирал и анализировал полученный материал, обрабатывал и интерпретировал данные, готовил публикации в соавторстве. Диссертационная работа является результатом исследований, проведенных автором в Анробиотехнологическом департаменте АТИ РУДН и на базе ФГБУ «Всероссийский центр карантина растений» в 2018–2022 гг.

**Список литературы.** Включают 84 наименования: справочники и нормативные документы, диссертации и авторефераты, книги и статьи на английском языке, онлайн и оффлайн ресурсы.

**Апробация результатов исследования.** По результатам диссертационного исследования опубликовано 7 статей, в том числе 2 – в научных журналах, включенных в базу данных International Journal и 2 – в базах данных Scopus, 2 – в рецензируемых журналах, включенных в список ВАК, и 1 оригинальная научная статья, представленная на конференциях.

**Структура диссертационного исследования.** Диссертационная работа состоит из введения, 3 глав, выводов и библиографии. Материал изложен на 127 страницах, включает 79 таблиц, 52 рисунков. Список литературы включает 84 источник.

## Благодарности

Автор выражает благодарность Бондаренко Галине Николаевне, кандидату биологических наук, начальнику испытательного лабораторного центра ФГБУ «Всероссийский центр карантина растений» за бесценную помощь во время проведения исследований и навыки, полученные в процессе работы над диссертацией

## II. ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Во **введении** рассматриваются обоснована актуальность и научная новизна исследования, сформулированы цель и задачи, а также положения, выносимые на защиту.

**Глава 1. Обзор литературы.** В этой главе представлены и обсуждаются общие сведения о карантинных и некарантинных видах плодовых мух *Drosophila* (*D. suzukii*, *D. simulans* и *D. melanogaster*).

Представлена информация о существующих методах молекулярной детекции и использовании вновь разработанных праймеров для идентификационного анализа и сравнения разных типов.

Распространение и вредоносность *Drosophila* sp. в России и Иране.

Таксономия, информация о видах и их жизненном цикле, морфологические характеристики, географическое распространение, список растений-хозяев, методы распространения, экономическое значение в глобальном распространении и проблемы применения.

Методы разработки и усовершенствования новых праймеров.

### Глава 2. Материалы и методы

Настоящее исследование проводилось в течение 2018-2022 годов во Всероссийском центре карантина растений (ВНИИКР) и Аграрно-технологическом институте РУДН, Москва, Россия.

Выделение ДНК из исследуемого материала (насекомые и личинки) проводили обработкой образцов Протеиназой К с последующим удалением белков без экстракции органическими растворителями и с использованием набора «ДНК Экстран-2», набор № НГ-511-100 («Синтол», Российская Федерация) по инструкции производителя. Поскольку особи видов *Drosophilae* очень малы, гомогенизация пестиками осуществлялась физическим разрушением тканей. Такой быстрый метод извлечения ДНК и обеспечивает преимущество во времени, особенно важное для неотложных диагностических анализов. Количественное определение экстрактов ДНК проводили на спектрофотометре NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific Inc., США).

Кроме того, для изучения видового состава рода *Drosophila* spp нами был отобран материал из Египта, Турции, Мексики, Ирана, а также на территории Российской Федерации; были отобраны различные растения-хозяева, в том числе сахарное яблоко (аннона), цитрусовые, ягоды, малина, черника, дыня, виноград, яблоки, гранаты, хурма, мандарины, манго. Мы изучили образцы личинок, куколок и изолированную ДНК. Весь материал (растительная ткань и выделенная ДНК) хранили при температуре -20°C.

Первым шагом для эффективного управления ростом популяции вредителя является его надежная и быстрая идентификация. Методы быстрой идентификации новых вредителей часто не доступны. Так обстоит дело с пятнистой крылатой дрозофилой, *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae). *D. suzukii* является вредителем, вызывающим серьезную угрозу во всем мире, как в странах, где эта муха уже обосновалась, так и в странах, где она в настоящее время отсутствует. Для отслеживания распространения *D. suzukii* на видоспецифичном уровне и распространения

*Drosophila* spp. на родоспецифичном уровне были разработаны две пары праймеров. Область-мишень для амплификации ДНК с помощью видоспецифичных праймеров *D. suzukii* была частью митохондриального гена субъединицы 1 цитохрома с-оксидазы (COI); это область, часто используемая для определения видов. ДНК амплифицировали в термоциклере Applied Biosystems Veriti (США) с 1,5 мкл экстракта ДНК, добавляли по 0,5 мкм каждого праймера; Выравнивание последовательностей проводили в BioEdit вместе с дополнительными последовательностями, полученными из GenBank.

Каждая пара праймеров, нацеленная на *Drosophila* sp., была разработана вручную и проверена с помощью праймера Premier 5 (PREMIER Biosoft International, Пало-Альто, США). В качестве мишени мы использовали ген COI, поскольку он хорошо охарактеризован для ряда видов из группы *Drosophila melanogaster*, включая последовательности, доступные для некоторых видов из подгруппы *Drosophila species*. Методы полимеразной цепной реакции (ПЦР) используются уже несколько десятилетий для идентификации вредителей и болезней по всему миру. Результаты показали, что эти праймеры точно идентифицируют необходимую область гена, которая также специфична для *Drosophila* sp.

Чтобы более точно оценить эффективность праймеров, мы протестировали их на других видах плодовых мух в лаборатории Аграрного университета Варамин, провинция Тегеран, Иран. Полученные результаты рассматриваются в разделе “результатов”.

### **Секвенирование и анализ праймеров**

В амплификаторе Applied Biosystems Veriti (США) муха и ДНК (каждого вида *D. suzukii*, *D. simulans* и *D. melanogaster* отдельно) амплифицировали с 1,5 мкл экстракта ДНК, 0,5 мкм каждого праймера (прямого и обратного), в течение двух минут происходила стадия начальной денатурации при 95°C с последующим 35 циклами по 10 с при 95°C, 40 с при 60°C и 20 с при 72°C соответственно. Окончательный этап элонгации проводили при 72 °C в течение 10 мин. Праймеры были разработаны вручную, что накладывало ограничения на размер ампликона до <750 п.н. и температурой между 55-65°C. Вторичная структура ампликона при температуре отжига праймера рассчитывалась с помощью веб-сервера mFold.

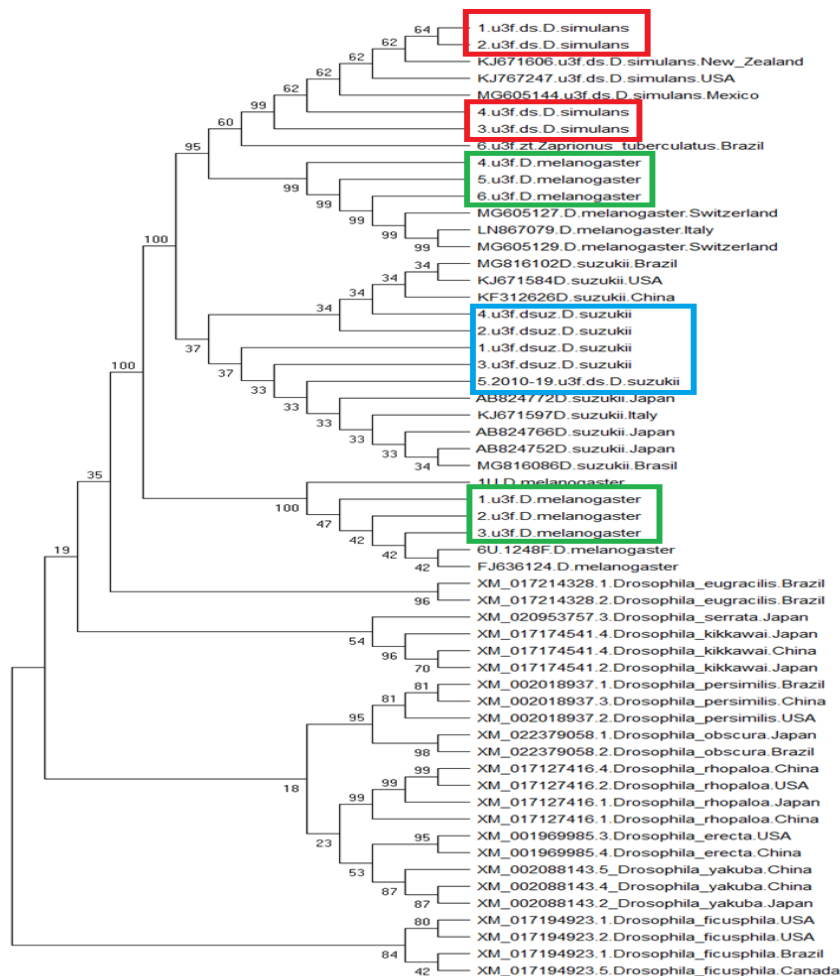
Секвенирование проводили с помощью генетического анализатора ABI-3500 (Applied Biosystems, США). На сайте Национального центра биотехнологической информации (NCBI) BLAST Web site (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) провели первичное сравнение результатов выборки с базой данных генетических последовательностей GenBank. Проверка, выравнивание и редактирование последовательностей выполнялись BioEdit v.7.0.5. 3. BioEdit последовательности сопоставлялись с дополнительными последовательностями, собранными из GenBank. Первая пара, нацеленная на *Drosophila* sp, была разработана вручную и принята Primer Premier 5 (PREMIER Biosoft International, Пало-Альто, США).

## Филогенетическое исследование:

Таблица 1.- Список секвенированных последовательностей

	Вид и номер	Страна	Данные из лаборатории Карантина растений, Россия	Данные из GenBank
1	<i>IU.D. melanogaster</i>	Турция	✓	
2	<i>6U.1248F.D. melanogaster</i>	Египет	✓	
3	<i>1.u3f.D. melanogaster</i>	Турция	✓	
4	<i>2. u3f.D. melanogaster</i>	Египет	✓	
5	<i>3. u3f.D. melanogaster</i>	Турция	✓	
6	<i>4. u3f.D. melanogaster</i>	Турция	✓	
7	<i>5. u3f.D. melanogaster</i>	Турция	✓	
8	<i>6. u3f.D. melanogaster</i>	Мексика	✓	
9	<i>MG605127. D. melanogaster</i>	Швейцария		✓
10	<i>LN867079. D. melanogaster</i>	Италия		✓
11	<i>MG605129. D. melanogaster</i>	Швейцария		✓
12	<i>FJ636124. D. melanogaster</i>	Швейцария		✓
13	<i>1.u3f.ds.D. Simulans</i>	Турция		
14	<i>2.u3f.ds.D. Simulans</i>	Иран	✓	
15	<i>3.u3f.ds.D. Simulans</i>	Турция	✓	
16	<i>4.u3f.ds.D. Simulans</i>	Мексика	✓	
17	<i>MG605144.u3f.ds.D. Simulans</i>	Мексика	✓	
18	<i>KJ767247.u3f.ds.D. Simulans</i>	США		✓
19	<i>KJ671606.u3f.ds.D. Simulans</i>	Новая		✓
20	<i>1.u3f.dsuz. D. Suzukii</i>	Зеландия		✓
21	<i>2.u3f.dsuz. D. Suzukii</i>	Канада		
22	<i>1.2010-19.u3f.ds.D. Suzukii</i>	Турция	✓	
23	<i>AB824772D.Suzukii</i>	Мексика	✓	
24	<i>KJ671597D.Suzukii</i>	Япония	✓	✓
25	<i>AB824766D.Suzukii</i>	Италия		✓
26	<i>AB824752D.Suzukii</i>	Япония		✓
27	<i>KF312626D.Suzukii</i>	Япония		✓
28	<i>MG816102D.Suzukii</i>	Китай		✓
29	<i>MG816086D.Suzukii</i>	Неизвестно		✓
30	<i>KJ671584D.Suzukii.</i>	Неизвестно		✓
31	<i>6.u3f.zt. Zaprionus Tuberculatus</i>	США		✓
32	<i>002088143.5 Drosophila yakuba.</i>	Мексика		
33	<i>017127416.1. Drosophila rhopaloo</i>	Китай		✓
34	<i>002088143.2 Drosophila yakuba</i>	Китай	✓	✓
35	<i>017127416.1. Drosophila rhopaloo</i>	Япония		✓
36	<i>017194923.1. Drosophila ficusphila.</i>	Япония		✓
37	<i>017174541.4. Drosophila kikkawai.</i>	США		✓
38	<i>001969985.3. Drosophila erecta.</i>	Китай		✓
39	<i>017214328.1. Drosophila eugracilis.</i>	США		✓
40	<i>022379058.1. Drosophila obscura.</i>	Бразилия		✓
41	<i>002018937.2. Drosophila persimilis.</i>	Япония		✓
42	<i>017194923.1. Drosophila ficusphila.</i>	США		✓
43	<i>017127416.1. Drosophila rhopaloo.</i>	Бразилия		✓

44	017194923.2. <i>Drosophila ficusphila</i> .	Китай		✓
45	017174541.2. <i>Drosophila kikkawai</i> .	США		✓
46	001969985.4. <i>Drosophila erecta</i> .	Япония		✓
47	017214328.2. <i>Drosophila eugracilis</i> .	Китай		✓
48	022379058.2. <i>Drosophila obscura</i> .	Бразилия		✓
49	002018937.1. <i>Drosophila persimilis</i> .	Бразилия		✓
50	017194923.2. <i>Drosophila ficusphila</i> .	Бразилия		✓
51	017127416.2. <i>Drosophila rhopaloo</i> .	США		✓
52	002018937.3. <i>Drosophila persimilis</i> .	США		✓
53	017174541.4. <i>Drosophila kikkawai</i> .	Китай		✓
54	020953757.3. <i>Drosophila serrata</i> .	Япония		✓



**Рис1.-** Молекулярная филогения рода *Drosophila* sp. и близкородственных родов (Diptera: *Drosophilidae*) (красные цвета *D. simulans*, зеленые цвета *D. melanogaster*, синие цвета *D. suzukii*)

### Эволюционный анализ методом максимального правдоподобия

История эволюционных процессов была выведена с помощью метода присоединения ветвей (Adams et al.). Показано оптимальное дерево с суммой длин ветвей = 5.00128004. Процент реплицированных деревьев, в которых ассоциированные таксоны сгруппированы вместе в бутстрэп-тесте (1000 реплик). Дерево изображено в том же масштабе, с длиной ветвей в тех же единицах, что и эволюционные расстояния, используемые для вывода филогенетического дерева.



Эволюционные расстояния были вычислены с использованием метода максимального сборного правдоподобия (Adams et al.). Кроме того, данные выражены в единицах числа базовых замен. Этот анализ включал 57 нуклеотидных последовательностей. Включенные кодонные позиции были 1-м+2-м+3-м+некодирующими. Все неоднозначные позиции были удалены для каждой пары последовательностей (опция попарного удаления). В конечном наборе данных было в общей сложности 460 позиций. Эволюционный анализ был проведен в MEGA X (Adams et al.). В качестве мишени мы использовали ген COI, поскольку он хорошо охарактеризован для ряда видов из группы *Drosophila suzukii*, включая последовательности, доступные для некоторых видов из подгруппы видов *D. suzukii*.

Виды дрозофил являются одними из самых широко изученных организмов в биологической науке. Тем не менее однозначное филогенетическое родство подсемейства *Drosophilidae*, которое должно послужить основой для различных исследований с использованием дрозофилид, до сих пор не вполне установлено. Чтобы решить эту проблему, мы провели филогенетический анализ с использованием последовательностей ядерной ДНК для нескольких видов, которые не были проанализированы в предыдущих исследованиях. В целом топология нашего дерева, включающего 21 вид, точно согласуется с теми, которые представлены van der Linde et al. (2010). В изображенном филогенетическом дереве идентифицированные с помощью разработанных праймеров виды *Drosophila suzukii*, *Drosophila simulans* и *Drosophila melanogaster* были помещены точно рядом с видами, взятыми из банка данных. Также было установлено родство других видов семейства Дрозофил, имеющие наиболее близкий генетический код.

В целом, согласно проведенным исследованиям и созданному филогенетическому дереву, *Drosophila simulans* является одним из родственных видов *Drosophila suzukii* и имеет очень близкий к *Drosophila suzukii* генетический код; он также включен в список карантинных объектов во многих странах (в том числе в Канаде, Польше и др.). Рекомендуется включить этот вид плодовой мухи и в Российский перечень карантинных объектов.

### **Дизайн специфических праймеров для идентификации *Drosophila sp* для ПЦР в реальном времени.**

Каждый праймер (прямой и обратный) использовался в качестве зонда. Для проведения ПЦР в смесь добавляли 1 мкл (10 пмоль) каждого праймера, 5 мкл master-mix5dd (HS-5x), 16 мкл H<sub>2</sub>O и 1 мкл ДНК. Общий объем составлял 25 мкл, смесь помещалась в амплификатор CFX 96 (Bio Rad, США) и запускался процесс ПЦР в реальном времени. Реакционная смесь представляла собой готовую к применению ПЦР-смесь Screen-Mix (Евроген, Россия). Результат был получен с помощью следующей процедуры: 94°C в течение 5 мин, затем 40 циклов по 95°C в течение 30 с, 70°C в течение 20 с и 72°C в течение 30 с. После амплификации был проведен анализ кривой плавления, и результаты были усреднены (программное обеспечение CFX Maestro).

## Список праймеров, использованных в данной работе

**Таблица 2.-** Разработанные праймеры для классической ПЦР и ПЦР в реальном времени

NO	Название праймера	Последовательность (5' to 3')	Метод	Мишени	Источник
1	12.dsuz. F 12.dsuz.R	5'CCTTCGTGAAGCCTTCTACCG -3' 5'GCACTCTTGATGGGAAGATC -3'	ПЦР	<i>Drosophila suzukii</i>	Данная работа
2	2. dsuz. F 2.dsuz.R	5'TCCTGCAGAAGGGATACGGA -3' 5'AACCACAGCGAACACCAGAA -3'	ПЦР	<i>Drosophila suzukii</i>	Данная работа
3	1.dsuz F 1. dsuz R 1. dsuz Probe	5'CCTTCGTGAAGCCTTCTACCG -3' 5'GCACTCTTGATGGGAAGATC -3' 5'CAACCGTTCTGGTGTTCGCTG -3'	ПЦР в реальном времени	<i>Drosophila suzukii</i>	Данная работа
4	7.dsuz. F 7.dsuz.R	5'CCTTCGTGAAGCCTTCTACCG -3' 5'GCACTCTTGATGGGAAGATC -3'	ПЦР	<i>Drosophila suzukii</i>	Данная работа
5	3.dsuz F 3. dsuz R 3. dsuz Probe	5'GGCGCCGGTGTCTGCCTGC -3' 5'CTGGTTTGATTGTGCTGCTGC -3' 5'GGCAATGGAACAGGGAAATTCC -3'	ПЦР в реальном времени	<i>Drosophila suzukii</i>	Данная работа
6	3.DM F 3.DM R 3.DM Probe	5'GGCGCCGGTGTCTGCCTGC -3' 5'CTGGTTTGATTGTGCTGCTGC -3' 5'GGCAATGGAACAGGGAAATTCC -3'	ПЦР в реальном времени	<i>Drosophila melanogaster</i>	Данная работа
7	4.DM F 4.DM R	5'AAGCTCTTCGGCATGGTGAT -3' 5'CCAGTCCATAGCCCTTCTGC -3'	ПЦР	<i>Drosophila melanogaster</i>	Данная работа
8	6.ds F 6.ds R	5'CCCAAGGATCGTGCTCTGTT -3' 5'TCCACACAATCGTCTCGCAA -3'	ПЦР	<i>Drosophila Simulans</i>	Данная работа
9	5.ds F 5.ds R 5.ds Probe	5'GCAACTTCTTCATTAACCTCG -3' 5'CTGGGGTGTGTGGGCTGATGT -3' 5'GATAGTAGCACAGACCACCG -3'	ПЦР в реальном времени	<i>Drosophila Simulans</i>	Данная работа

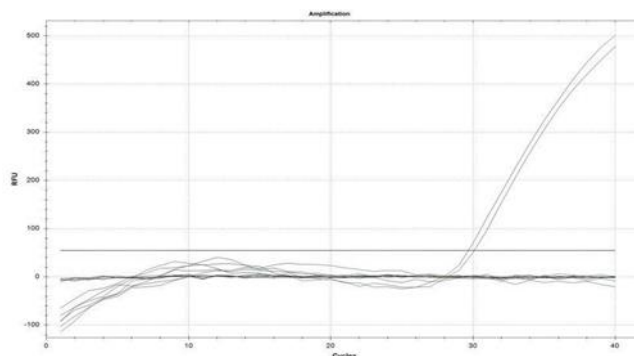
**Глава 3. Результаты и обсуждение.** Разработанные праймеры для идентификации *D. suzukii*, *D. simulans* и *D. melanogaster* оценивали с использованием нескольких штаммов *Drosophila* sp. из различных регионов происхождения. Для идентификации использовали как ПЦР в реальном времени, так и классическую ПЦР.

**Результаты молекулярной диагностики различных видов р. *Drosophila* в РФ:**

**Результат молекулярной диагностики видов *Drosophila suzukii* с праймерами (3. Dsuz F/R. probe), ПЦР в реальном времени:**

**Таблица 3.-** Список видов плодовых мух, использованных при выявлении *Drosophila suzukii* методом ПЦР (праймер 3. Dsuz F/R. probe)

№	Название вида	Страна происхождения (данные ВНИИКР)	ПЦР в реальном времени
1	<i>Drosophila suzukii</i>	Египет	+
2	<i>Drosophila suzukii</i>	Турция	+
3	<i>Drosophila melanogaster</i>	Россия	
4	<i>Drosophila simulans</i>	Турция	
5	<i>Zaprionus indianus</i>	Турция	
6	<i>Ceratitis capitata</i>	Турция	
7	<i>Megaselia scalaris</i>	Коллекция ВНИИКР	
8	<i>Bactrocera dorsalis</i>	Коллекция ВНИИКР	
9	<i>Myiopardalis pardalina</i>	Турция	
10	<i>Sarcophagi similis</i>	Китай	
11	<i>Zaprionus tuberculatus</i>	Коллекция ВНИИКР	
12	<i>Zaprionus indianus Malloch</i>	Турция	
13	Контроль	Вода	-



**Рис 2.-** Эффективность ПЦР в реальном времени для видов *D. suzukii* (праймеры 3. Dsuz F/R. probe)

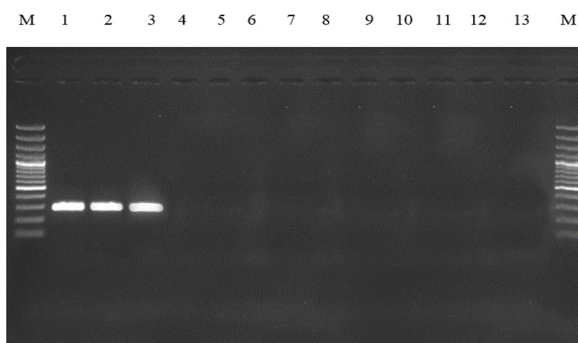
Разработанные праймеры для ПЦР в реальном времени (3. Dsuz F/R. probe) были использованы на двенадцати образцах видов плодовых мух при температуре 600 °С. На рисунке 2 показаны два восходящих пика, которые указывают на положительный контроль с *D. suzukii* (виды из Египта и Турции).

Из 13 образцов, включая контроль, с неизвестной последовательностью только 2 (образцы: 1, 2) были положительно идентифицированы как *D. Suzukii* благодаря успешной амплификации и правильной пиковой температуре отжига праймера (рис 2). Никакой другой образец не показал положительной амплификации.

Значения  $C_q$  обратны количеству нуклеиновой кислоты, находящейся в образцах, и коррелируют с количеством целевых копий, полученных в образце. В результате значения  $C_q$  появились в областях 25,19 и 26,17 и достигли там наибольших значений. Более низкие значения  $C_q$  (до цикла 29) указывают на большое количество целевой последовательности. Более высокие значения  $C_q$  (после цикла 38) означают меньше нуклеиновой кислоты-мишени.

Разработка более чувствительных праймеров может оказать большую помощь Всемирной карантинной организации из-за сходства видов друг с другом. Все образцы были идентифицированы в трех повторностях, один из них приведен здесь в качестве примера.

**Результат молекулярной диагностики видов *Drosophila suzukii* с праймерами (7. dsuz. F/R), классическая ПЦР:**



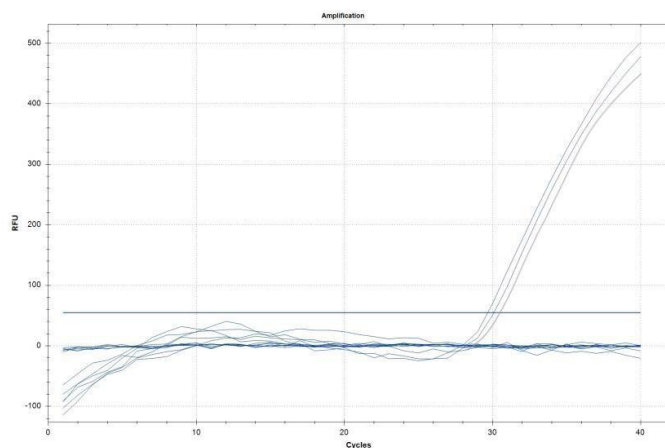
**Рис 3.-** Испытание разработанного 7. дсуз. Праймеры F/R с разным количеством ДНК *D. suzukii*

Результат на геле демонстрирует селективность сконструированных пар праймеров 7. dsuz. Ф/Р. Изображение электрофореза (рис. 3) номер образца: 1, 2, 3 - *Drosophila suzukii* (Мексика, Турция, Египет), 4 - *Drosophila simulans*, 5 - *Drosophila melanogaster*, 6. - *Zaprionus indianus*, 7 - *Megaselia scalaris*, М - Маркер (100–1000) п.н. Отрицательный контроль: контроль выделения ДНК и контроль амплификации.

**Результат молекулярной диагностики видов *Drosophila melanogaster* с праймерами (3.дм. F/R.probe), ПЦР в реальном времени:**

**Таблица 4.-** Список видов плодовых мух, использованных при выявлении *Drosophila melanogaster* методом ПЦР (праймеры 3.dm.F/R. probe)

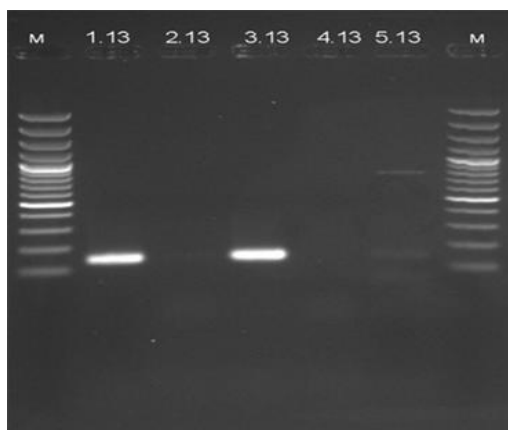
№	Название вида	Страна происхождения(данные ВНИИКР)	ПЦР в реальном времени
1	<i>Drosophila melanogaster</i>	Турция	+
2	<i>Drosophila suzukii</i>	Египет	
3	<i>Drosophila simulans</i>	Россия	
4	<i>Zaprionus indianus</i>	Канада	
5	<i>Ceratitis capitata</i>	Турция	
6	<i>Megaselia scalaris</i>	Турция	
7	<i>Bactrocera dorsalis</i>	Коллекция ВНИИКР	
8	<i>Myiopardalis pardalina</i>	ВНИИКР	
9	<i>Drosophila melanogaster</i>	Египет	+
10	<i>Sarcophagi similis</i>	Китай	
11	<i>Zaprionus tuberculatus</i>	ВНИИКР	
12	<i>Drosophila funebris</i>	Турция	
13	<i>Drosophila melanogaster</i> (54/89861)	Иран	+
14	Контроль	Вода	-



**Рис 4.-** Эффективность метода ПЦР в реальном времени при идентификации видов *Drosophila melanogaster* (праймеры 3.dm. F/R. probe)

В этих результатах мы имеем 14 образцов для идентификации с разработанным праймером (праймеры 3.dm.F/R. probe) и Температура: 59,4 °С, 3 образца *Drosophila melanogaster* в качестве пассивного контроля, 10 образцов от подвидов, названия которых приведены в (таблице 4) (рис 4). Кроме того, имеется случай отрицательного контроля (образец 14). Два экземпляра были положительно идентифицированы как *Drosophila melanogaster*; образцы (1, 9 и 13) показали пики отжига в приемлемом диапазоне температур: 59,04 °С и были четко отделены от других видов. Других пиков не наблюдалось.

**Результат молекулярной диагностики видов *Drosophila melanogaster* с праймерами (4.DM. F/R), классическая ПЦР:**



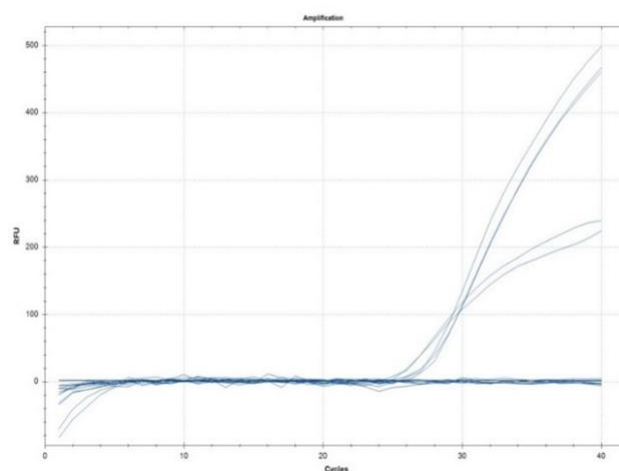
**Рис 5.-** Апробация разработанного 4.DM. Праймеры F/R с разным количеством ДНК *D. melanogaster*

Результат на геле демонстрирует селективность сконструированных пар праймеров (4.DM.F/R) для классической ПЦР. Номер образца: 1.13 - *Drosophila melanogaster* (Турция), 2.13 - *Drosophila simulans* (РФ), 3.13 - *Drosophila melanogaster* (Египт), 4.13 - *Drosophila suzukii* (Турция), 5.13 – К (отрицательный контроль включают экстракцию и амплификацию ДНК. М - ДНК-маркер (100-1000) б.п.

**Результат молекулярной диагностики видов *Drosophila simulans* с праймерами (5.ds.F/R. probe), ПЦР в реальном времени:**

**Таблица 5.-** Список видов плодовых мух, использованных при выявлении *Drosophila simulans* методом ПЦР (праймеры 5.ds.F/R. probe)

№	Название вида	Страна происхождения(данные ВНИИКР)	ПЦР в реальном времени
1	<i>Drosophila simulans</i>	Турция	+
2	<i>Drosophila suzukii</i>	Египет	
3	<i>Drosophila melanogaster</i>	Россия	
4	<i>Zaprionus indianus</i>	Канада	
5	<i>Ceratitis capitata</i>	Турция	
6	<i>Megaselia scalaris</i>	Турция	
7	<i>Bactrocera dorsalis</i>	Неизвестный	
8	<i>Myiopardalis pardalina</i>	Мексика	
9	<i>Sarcophagi similis</i>	Турция	
10	<i>Zaprionus tuberculatus</i>	Китай	
11	<i>Drosophila funebris</i>	Неизвестный	
12	<i>Drosophila simulans (ds/2)</i>	Россия	+
13	<i>Drosophila simulans</i>	Россия	+
14	Контроль	Вода	-

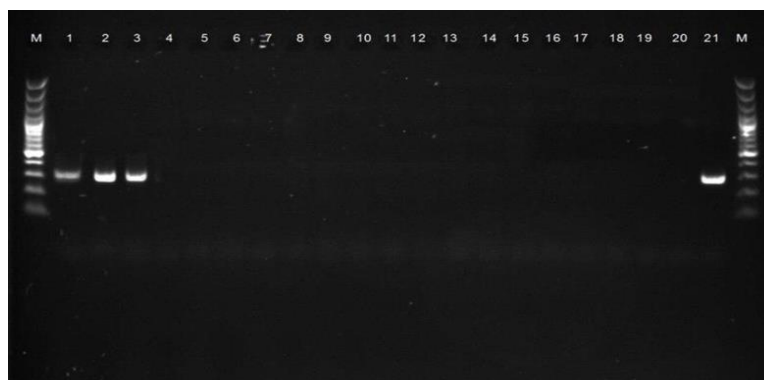


**Рис 6.-** Эффективность ПЦР в реальном времени для идентификации *D. simulans* (праймеры 5.ds.F/R. probe)

На рисунке 6 показаны пять восходящих пиков, которые указывают на положительный контроль *D. simulans*. В качестве маркеров использовали *Zaprionus indianus* и *Megaselia scalaris*. Других пиков не наблюдалось. На графике пики двух образцов *D. simulans* различны, так как оба типа ДНК, выделенные из *D. simulans*, различались по качеству, площади обнаружения и количеству.

В таблице 5 из тринадцати образцов только три (1, 12 и 13) были положительно идентифицированы как *Drosophila simulans* (положительный контроль) благодаря успешной амплификации и правильной максимальной температуре отжига. Лучшим из них стал образец №1. Ни один другой образец не показал такой успешной амплификации.

**Результат молекулярной диагностики видов *Drosophila simulans* с праймерами (6.ds. F/R), классическая ПЦР**



**Рис 7.-** Тестирование разработанных праймеров 6.ds.F/R с различным количеством ДНК *D. simulans*

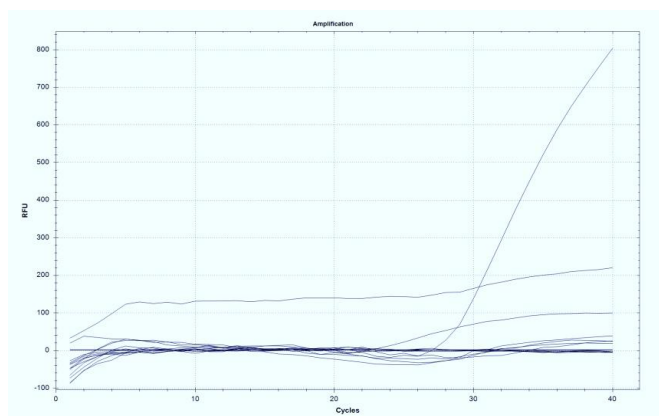
Результат на геле демонстрирует селективность сконструированных пар праймеров 6.ds.F/R. 1, 2, 3 - *Drosophila simulans*, 4-11 - *Drosophila suzukii*, 12-15 - *Drosophila melanogaster*, 16, 17 - *Zaprionus indianus*. *Megaselia scalaris*: 18, 19. К<sup>-</sup>: 20: отрицательный контроль (dH<sub>2</sub>O); К<sup>+</sup>: 21 (*Drosophila simulans*). М: ДНК-маркер (100-1000) б.п.

**Результаты анализа образцов из Ирана**

**Результат молекулярной диагностики видов *Drosophila suzukii* с праймерами (5.ds. F/R. probe), ПЦР в реальном времени:**

**Таблица 6. -** Список видов плодовых мух, использованных при выявлении *Drosophila suzukii* иранской популяции методом ПЦР (праймер 1. dsuz. F/R. probe)

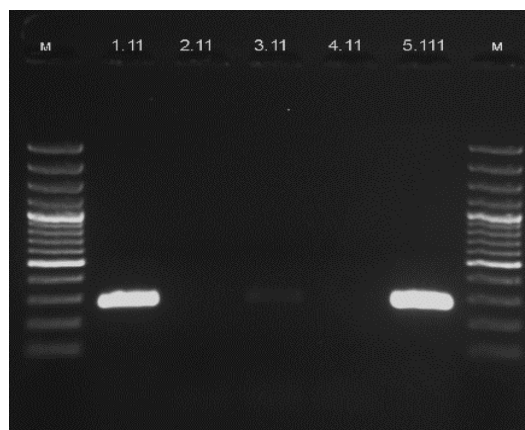
№	Название вида	Страна происхождения (данные ВНИИКР)	ПЦР в реальном времени
1	<i>Drosophila suzukii</i>	Иран	+
2	<i>Drosophila suzukii</i>	Иран	+
3	<i>Drosophila funebris</i>	Турция	
4	<i>Drosophila suzukii</i>	Иран	+
5	<i>Drosophila melanogaster</i>	Турция	
6	<i>Drosophila simulans</i>	Россия	
7	<i>Zaprionus indianus</i>	Иордания	
8	<i>Ceratitis capitata</i>	Турция	
9	<i>Megaselia scalaris</i>	Иран	
10	<i>Bactrocera dorsalis</i>	Иран	
11	<i>Myiopardalis pardalina</i>	Турция	
12	<i>Zaprionus tuberculatus</i>	Турция	
13	<i>Zaprionus indianus Malloch</i>	Турция	
14	Контроль	вода	-



**Рис 8.** – Эффективность ПЦР в реальном времени для идентификации *D. suzukii* иранской популяции (праймер 1. dsuz. F/R probe)

В этих результатах мы имеем 13 образцов для идентификации с разработанным праймером (праймер 1. dsuz. F/R. probe) и температурой: 60,08°C, 3 образца *D. suzukii* (из Ирана). Из 13 образцов с другим подвидом только 3 (образцы: 1, 2, 4) были положительно идентифицированы как *D. suzukii* (положительный контроль) благодаря успешной амплификации и правильной пиковой температуре отжига праймера (рис 8).

**Результат классической ПЦР для диагностики *Drosophila suzukii* иранского происхождения (праймер 7. dsuz. F/R):**



**Рис 9.-** Тестирование разработанных праймеров 7. dsuz. F/R с разным количеством ДНК *D suzukii*

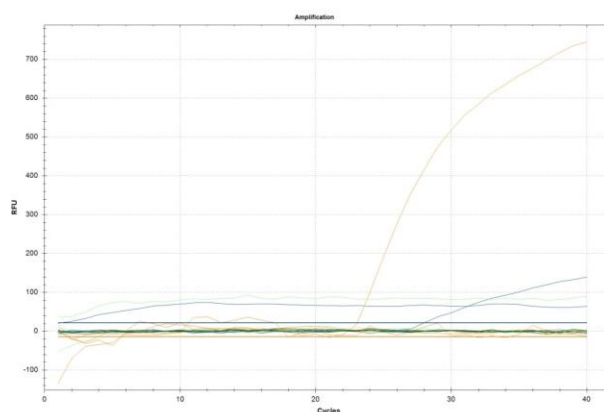
Результат на геле демонстрирует селективность сконструированных пар праймеров (4.DM. F/R) для классическая ПЦР. Номер образца: 1.11 - *Drosophila suzukii* (Иран), 2.11 - *Drosophila simulans* (Турция), 3.11 - *Drosophila melanogaster* (Египет), 4.11 - К-, 5.11 - К+. (*Drosophila suzukii* из Ирана). Отрицательные контроли включают экстракцию и амплификацию ДНК. М: ДНК-маркер (100-1000) б.п.

**Результат ПЦР в реальном времени на *Drosophila melanogaster* иранского происхождения (праймер 3.dm. F/R. probe):**



**Таблица 7.** - Список видов плодовых мух, использованных при выявлении *Drosophila melanogaster* иранского происхождения методом ПЦР (праймер 3.dm.F/R. probe)

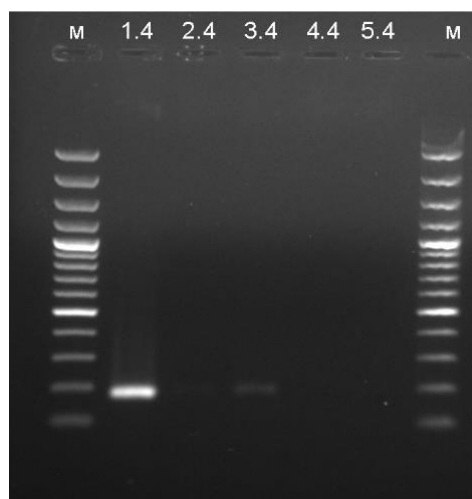
№	Название вида	Страна происхождения(данные ВНИИКР)	Результаты ПЦР в реальном времени
1	<i>Drosophila melanogaster</i>	Иран	+
2	<i>Drosophila melanogaster</i>	Иран	+
3	<i>Drosophila suzukii</i>	Турция	
4	<i>Drosophila funebris</i>	Иран	
5	<i>Drosophila melanogaster</i>	Турция	
6	<i>Drosophila simulans</i>	Россия	
7	<i>Zaprionus indianus</i>	Иордания	
8	<i>Ceratitis capitata</i>	Турция	
9	<i>Megaselia scalaris</i>	Иран	
10	<i>Bactrocera dorsalis</i>	Иран	
11	<i>Myiopardalis pardalina</i>	Турция	
12	<i>Zaprionus tuberculatus</i>	Турция	
14	<i>Zaprionus indianus Malloch</i>	Турция	
15	Контроль	Вода	-



**Рис 10.** - Результат ПЦР в реальном времени для идентификации *Drosophila melanogaster* иранского происхождения (праймер 3.dm.F/R. probe)

В этих результатах мы имеем 14 образцов для идентификации с разработанным праймером (праймеры 3.dm.F/R probe) при температуре: 59,4 о С. Два образца были положительно идентифицированы как *Drosophila melanogaster*; образцы (1, 2) показали пики отжига и были четко отделены от других видов. Других пиков не наблюдалось.

**Результат классической ПЦР для диагностики *Drosophila melanogaster* иранского происхождения (праймер 4. DM. F/R):**



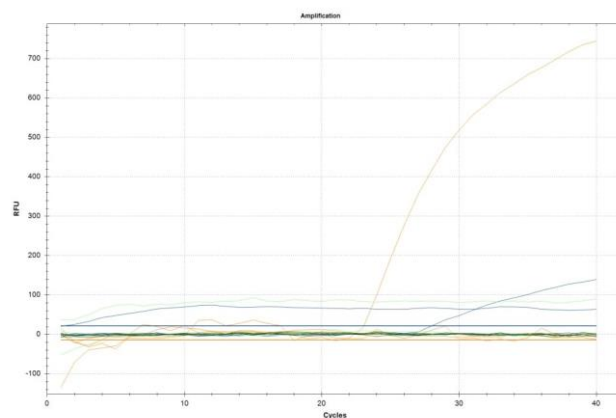
**Рис 11.- Испытание разработанного праймера 4. ДМ. F/R с разным количеством ДНК *D. melanogaster***

Результат на геле демонстрирует селективность сконструированных пар праймеров (4.ДМ. F/R) для классическая ПЦР. Номер образца: 1.4 - *Drosophila melanogaster* (Иран), 2.4 - *Drosophila simulans* (Турция), 3.4 - *Drosophila melanogaster* (Турция), 4.4 - *Drosophila suzukii* (Иран), 5.4. К-. Отрицательные контроли включают экстракцию и амплификацию ДНК. М: ДНК-маркер (100-1000) б.п.

**Результат ПЦР в реальном времени при диагностике *Drosophila simulans* иранского происхождения (5.ds. F/R.probe):**

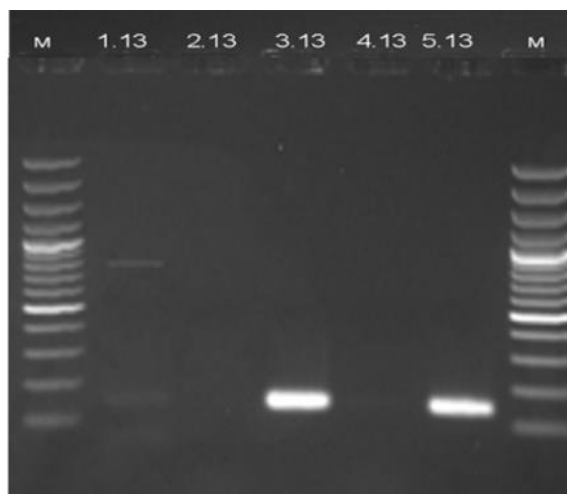
**Таблица 8.- Список видов плодовых мух, использованных при выявлении *Drosophila simulans* иранского происхождения с помощью ПЦР (праймер 5.ds.F/R.probe)**

№	Название вида	Страна происхождения (данные ВНИИКР)	Результат
1	<i>Drosophila simulans</i>	Иран	+
2	<i>Drosophila simulans</i>	Иран	+
3	<i>Drosophila melanogaster</i>	Россия	
4	<i>Zaprionus indianus</i>	Канада	
5	<i>Drosophila simulans</i>	Иран	+
6	<i>Ceratitis capitata</i>	Турция	
7	<i>Megaselia scalaris</i>	Неизвестный	
8	<i>Bactrocera dorsalis</i>	Турция	
9	<i>Myiopardalis pardalina</i>	Турция	
10	<i>Sarcophagi similis</i>	Китай	
11	<i>Zaprionus tuberculatus</i>	Неизвестный	
12	<i>Drosophila funebris</i>	Россия	
13	<i>Drosophila suzukii</i>	Иран	
14	К <sup>-</sup>	Вода	-



**Рис 12.-** Эффективность ПЦР в реальном времени для идентификации *D. simulans* иранского происхождения (праймер 5.ds. F/R. probe)

В таблице 8 из 13 образцов три из них (количество образцов: 1, 2, 5) были положительно идентифицированы как имитаторы *Drosophila simulans* из Ирана благодаря успешной амплификации и правильной максимальной температуре отжига (рис. 12). ). Лучшим из них стал образец №1. Ни один другой образец не показал такой успешной амплификации.



**Рис 13.-** Тестирование разработанных праймеров 6.ds.F/R с различным количеством ДНК *D. simulans*

Результат на геле демонстрирует селективность разработанных пар праймеров (6.ds. F/R) для классической ПЦР. Номер образца: 1.13 - *Drosophila melanogaster* (Турция), 2.13 - *Drosophila suzukii* (РФ), 3.13 - *Drosophila simulans* (Иран), 4.13 - К-, 5.13- К+. Отрицательные контроли включают экстракцию и амплификацию ДНК. М: ДНК-маркер (100-1000) б.п.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании проведенного исследования можно сделать следующие выводы:

- Для идентификации *Drosophila suzukii*, *Drosophila simulans* и *Drosophila melanogaster*, было создано девять праймеров: 5 праймеров для традиционной ПЦР и 4 для ПЦР в реальном времени с чрезвычайно высокой точностью идентификации. Праймеры могут точно определить области генов исследуемых видов, выделяя их из нескольких близкородственных видов р. *Drosophila*, часть из которых относится к списку карантинных объектов.
- Согласно филогенетическому дереву, 3 вида *Drosophila suzukii*, *Drosophila simulans* и *Drosophila melanogaster*, попали каждый в отдельную кладу, построенное филогенетическое дерево также показывает, что разработанные с максимальной точностью праймеры выявили каждый вид *Drosophila* среди подвидов Is.
- Дизайн праймеров предусматривал оптимизацию температуры, и после трех итераций тестирования каждого образца была выбрана оптимальная температура для их использования.
- Практически все разработанные праймеры были также протестированы в Карантинной организации Ирана. Результаты их чувствительности и точности были аналогичны российским и одобрены для использования карантинной службой Ирана. Однако, пара праймеров 12. праймеры dsuz F/R для классической ПЦР и 1.dsuz.F/R., разработанные для ПЦР в реальном времени для идентификации *Drosophila suzukii*, в Иране не показали высокой точности и качества идентификации.
- Согласно проведенным исследованиям и созданному филогенетическому дереву, *Drosophila simulans* является одним из родственных видов *Drosophila suzukii* и имеет генетический код, очень близкий к *Drosophila melanogaster*. Он также включен в список карантинных объектов во многих странах (в том числе в Канаде, Польше и др.). Рекомендовано включение вида плодовой мухи *Drosophila simulans* в список карантинных объектов в России.

**Список литературы** включает 84 наименований: справочники и нормативные документы, диссертации и авторефераты, книги и статьи на английском языке, интернет- и офлайн-ресурсы.

### **Список работ, опубликованных автором по теме диссертации:**

*Статьи в изданиях, индексируемых Scopus и Web of Science*

1. **Naserzadeh Y.**, Mahmoudi N., Pakina E., Zargar M. Molecular identification and primer design for spotted wing drosophila (*Drosophila suzukii*) // Research on Crops. – 2020. – Т. 21, № 2. – С. 364-369.
2. **Naserzadeh Y.**, Bondarenko G., Kolesnikova E., Zargar M., Pakina E., Engeribo A. Molecular identification and design of specific primer for quarantine fruit fly (*Drosophila suzukii*) // Research on Crops. – 2020. – Т. 21, № 3.

*Статьи в международных изданиях*

1. **Naserzadeh Y.**, Mahmoudi N., Gonzalez Cabrera J, Engeribo A. Molecular Identification, Biological and Reproductive Characteristics of *Drosophila Suzukii* Developed in Six Host Plants of Economic Importance in Iran// Agri Res & Tech: Open Access J– 2021 Т. 26 , № 2. 556332

2. **Naserzadeh Y.**, Mahmoudi N., Pakina E. Biological and Reproductive Characteristics of the Mediterranean Fruit Fly, *Ceratitis capitata* (Dip.: Tephritidae), on Six Host Plants Under Vitro Conditions // reproduction –2020 – Т.12, № 14. – С. 15.

*Статьи в изданиях из списка ВАК*

1. **Naserzadeh Y.**, Pakina E. N., Nafchi A. M., Gadzhikurbanov A. S. Specific Identification Method based on PCR for *Drosophila melanogaster* // Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Агронимия и животноводство. – 2020. – Т. 15, № 2. – С. 134-141.
2. **Naserzadeh Y.**, Bondarenko G. N., Kolesnikova E. V., Pakina E. N. Phylogenetic analysis and designing new primers for molecular identification of *Drosophila suzukii* // RUDN Journal of Agronomy and Animal Industries. – 2021. – Т. 16, № 2. – С. 137-145.

*Материалы научных конференций*

1. **Naserzadeh Y.**, Mahmoudi N., Pakina E. SPECIFIC IDENTIFICATION METHOD FOR *DROSOPHILA MELANOGASTER* // НАУКА И ИННОВАЦИИ- СОВРЕМЕННЫЕ КОНЦЕПЦИИ, Москва, 22 мая 2020 г.. Издательство Инфинити –, 2020. – С. 155-161. У67. ISBN 978-5-905695-43-8

## АННОТАЦИЯ

### МОЛЕКУЛЯРНАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ И ДИЗАЙН СПЕЦИФИЧЕСКИХ ПРАЙМЕРОВ ДЛЯ КАРАНТИННЫХ И НЕКАРАНТИННЫХ ВИДОВ ПЛОДОВЫХ МУШЕК (*DROSOPHILA SUZUKII*, *DROSOPHILA SIMULANS*, *DROSOPHILA MELONOGASTER*)

Семейство *Drosophilidae* включает более 3750 видов по всему миру, и более 2000 из них являются видами *Drosophila*. Пятнистокрылая дрозофила (SWD), *Drosophila suzukii* — один из самых опасных видов этого семейства. Насекомые живут в неповрежденных созревающих плодах, откладывая в них яйца. Целью данного исследования было разработать и протестировать простой и экономичный ПЦР-анализ, а также разработать специфические пары праймеров для идентификации вредителей методом ПЦР в реальном времени и классической ПЦР, которые позволяют наиболее точно обнаруживать *Drosophila* sp. Точный контроль и идентификация очень важны при организации карантинных мероприятий. Согласно нашим исследованиям среди статей и исследованиям ученых, а также поиску на официальных сайтах карантинных и некарантинных вредителей, в настоящее время полноценного анализа *Drosophila suzukii* в России нет. Однако данный проект мы рассматриваем как поиск способа быстрого выявления и разграничения вида этих опасных плодовых мушек, включая карантинные объекты (*Drosophila suzukii*, *Drosophila simulans*, *Drosophila melanogaster*), так как Россия импортирует и экспортирует фрукты и овощи в огромных объемах, что требует более жесткого контроля и новых способов быстрого обнаружения и устранения этой угрозы.

## SUMMARY

### MOLECULAR IDENTIFICATION AND DESIGN OF SPECIFIC PRIMERS FOR QUARANTINE AND NON-QUARANTINE FRUIT FLY SPECIES (*DROSOPHILA SUZUKII*, *DROSOPHILA SIMULANS*, *DROSOPHILA MELONOGASTER*)

The *Drosophilidae* family includes over 3,750 species worldwide, and over 2,000 of them are *Drosophila* species. The spotted-winged fruit fly (SWD), *Drosophila suzukii*, is one of the most dangerous species of this family. Insects live in intact ripening fruits, laying eggs in them. The aim of this study was to develop and test a simple and economical PCR assay, as well as to develop specific primer pairs for pest identification by real-time PCR and classical PCR, which allow the most accurate detection of *Drosophila* sp. Accurate control and identification is very important when organizing quarantine measures. According to our research among articles and research by scientists, as well as a search on official websites for quarantine and non-quarantine pests, there is currently no complete analysis of *Drosophila suzukii* in Russia. However, we consider this project as a search for a way to quickly identify and distinguish between the species of these dangerous fruit flies, including quarantine objects (*Drosophila suzukii*, *Drosophila simulans*, *Drosophila melanogaster*), since Russia imports and exports fruits and vegetables in huge volumes, which requires more stringent control and new ways to quickly detect and eliminate this threat.