

УДК 577.212:595.753

М. М. Воробьёва

Кандидат биологических наук, старший преподаватель кафедры биолого-химического образования,
УО «Мозырский государственный педагогический университет им. И. П. Шамякина»,
г. Мозырь, Республика Беларусь

ВЫЯВЛЕНИЕ ГАПЛОТИПОВ COI МЕТОДОМ ПЦР-ПДРФ АНАЛИЗА У ТЛЕЙ-ПОЛИФАГОВ

Проанализировано 1779 нуклеотидных последовательностей гена субъединицы 1 цитохромоксидазы *c* (COI) тлей с широким перечнем кормовых растений (*Acyrtosiphon malvae* Kalt., *Aphis craccivora* Koch, *Aphis fabae* Scop., *Aphis gossypii* Glov., *Aphis spiraeicola* Patch, *Aulacorthum solani* (Kalt.), *Brachycaudus helichrysi* Kalt., *Myzus persicae* (Sulz.) и *Macrosiphum euphorbia* Thorn.). Результаты анализа показали, что тли-полифаги обладают высоким внутривидовым полиморфизмом гена COI. На основе полученных данных построили рестрикционные карты и разработали ПЦР-ПДРФ ключи для идентификации конкретных гаплотипов COI у анализируемых видов тлей-полифагов.

Ключевые слова: тли-полифаги, рестрикционные карты, ПЦР-ПДРФ ключи, *A. malvae*, *A. craccivora*, *A. fabae*, *A. gossypii*, *A. spiraeicola*, *A. solani*, *B. helichrysi*, *M. persicae*, и *M. euphorbia*.

Введение

Настоящие тли (Homoptera; Aphidoidea) – сравнительно небольшое надсемейство насекомых, включающее на сегодняшний день более 5000 видов, многие среди которых являются опасными вредителями сельскохозяйственных и иных возделываемых культур [1]. Благодаря таким особенностям биологии и экологии как гетерогония, морфологический полиморфизм, быстрая смена генераций, способность к эффективному расселению, высокий уровень адаптации к растениям-хозяевам, широкая экологическая валентность и др., эти насекомые успешно адаптировались к разнообразным условиям окружающей среды и освоили в качестве кормовых объектов практически все группы семенных растений [2].

Адаптации тлей к новым природно-климатическим условиям свидетельствует о высоком уровне экологической пластичности этого таксона насекомых, которая генетически детерминирована и поддерживается естественным отбором. Как известно, внутривидовая генетическая вариабельность, также как и морфологическая изменчивость, и экологическая пластичность является ключевым фактором, обеспечивающим выживание популяций в динамичных условиях окружающей среды и способствующим противостоянию давления естественного отбора [3], [4]. В связи с этим изучение внутривидового полиморфизма у тлей имеет важное научно-теоретическое и практическое значение для понимания механизмов, обеспечивающих высокую экологическую пластичность насекомых этого таксона и составления прогнозов оценки стабильности популяций и переносчиков заболеваний растений.

Особого внимания среди тлей заслуживают виды, обладающие способностью питаться более чем на 100 видах растений, принадлежащих к разным ботаническим семействам. Согласно литературным данным, к числу таких видов принадлежат *Acyrtosiphon malvae* Kalt., *Aphis craccivora* Koch, *Aphis fabae* Scop., *Aphis gossypii* Glov., *Aphis spiraeicola* Patch, *Aulacorthum solani* (Kalt.), *Brachycaudus helichrysi* Kalt., *Myzus persicae* (Sulz.) и *Macrosiphum euphorbia* Thorn. [5]. Перечисленные выше тли являются рецетными видами фауны Беларуси и опасными вредителями сельскохозяйственных и иных хозяйственно ценных растений [2], в связи с чем были выбраны в качестве модельных объектов в рамках настоящего исследования.

Важными критериями, отражающими уровень внутривидового генетического полиморфизма, являются такие параметры, как, например, число и дивергенция гаплотипов, рассчитанные путем сравнения нуклеотидных последовательностей ортологических и паралогических генов. Результаты исследований показали, что у тлей конкретные гаплотипы генов субъединицы 1 цитохромоксидазы *c* (COI) и цитохром *b* (*cyt b*) ассоциированы с линиями тлей, питающимися на

разных кормовых растениях, что свидетельствует о приуроченности гаплотипов к конкретным растениям-хозяевам [6], [7], в связи с чем логично предположить, что тли-полифаги должны иметь большое число гаплотипов, а значит обладать высоким уровнем внутривидовой генетической вариабельности и, соответственно, высоким потенциалом выживаемости.

Поскольку генетическая вариабельность является залогом успешной адаптации видов к изменяющимся условиям окружающей среды и реализации их репродуктивного потенциала, как было сказано выше, в рамках настоящего исследования ставилась задача провести сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей гена COI тлей-полифагов и разработать ПЦР-ПДРФ ключи для изучения гаплотипического разнообразия с целью оценки внутривидового генетического полиморфизма.

Методы исследования

В исследование включены собственные расшифрованные нуклеотидные последовательности гена COI, полученные в рамках проведения курсов Глобальной таксономической инициативы «Быстрая идентификация инвазивных видов для достижения целевой задачи Айти 9, используя техники и методы ДНК-штрихкодирования» при финансовой поддержке Секретариата Конвенции о биоразнообразии и Фонда биоразнообразия Японии, а также последовательности этого гена, представленные в Международных генетических базах данных NCBI (GenBank) и BOLDv.4 [8], [9] (рисунок 1).

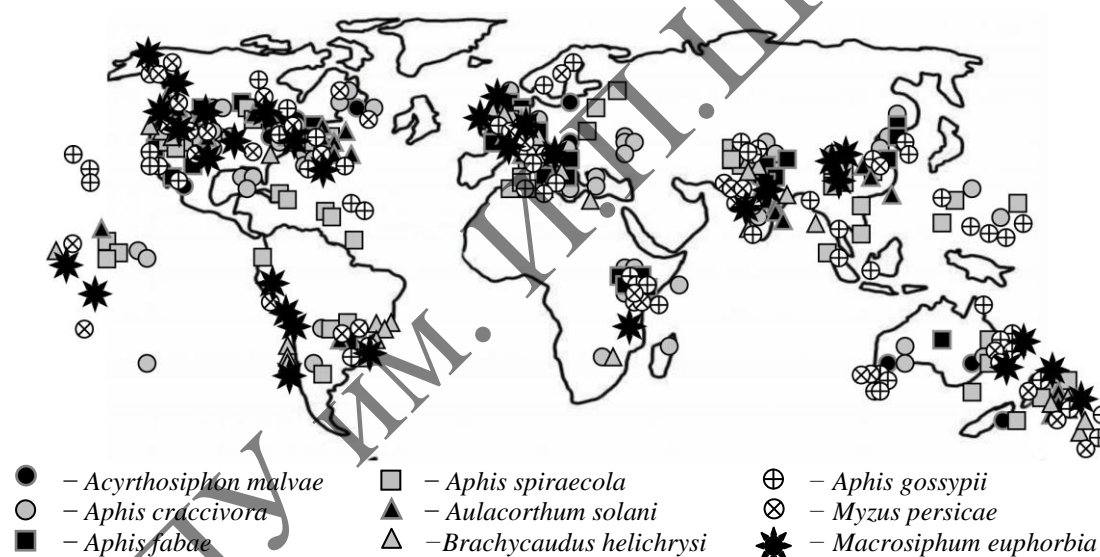


Рисунок 1. – Регионы происхождения нуклеотидных последовательностей гена COI тлей, используемых в рамках настоящего исследования

Общая выборка составила 1779 нуклеотидных последовательностей гена COI, среди которых 44 принадлежали *A. malvae*, 202 – *A. craccivora*, 402 – *A. fabae*, 419 – *A. gossypii*, 227 – *A. spiraeicola*, 77 – *A. solani*, 135 – *B. helichrysi*, 98 – *M. persicae* и 175 – *M. euphorbia*. Для каждого вида тлей в отдельности было проведено множественное выравнивание нуклеотидных последовательностей гена COI и рассчитаны парные внутривидовые генетические дистанции (GD) в программе MEGA8, а число (h) и дивергенцию (Hd) гаплотипов – в программе DNAsp. Поиск сайтов рестрикции осуществлен в программе BioEdit. Графические рестрикционные карты построены в программе pDRAW32 1.1.112 с использованием всех известных ферментов рестрикции и их изошизомеров. По результатам анализа рестрикционных карт разработаны ПЦР-ПДРФ ключи.

Результаты исследования и их обсуждение

Анализ литературных данных [5], [10] показал, что в перечень кормовых растений *A. malvae* входит 109 видов растений, принадлежащих к 26 ботаническим семействам, *A. craccivora* – 804 вида растений, принадлежащих к 77 ботаническим семействам, *A. fabae* – 1433 видов растений, принадлежащих к 108 ботаническим семействам, *A. gossypii* – 1227 видов растений, принадлежащих к 119 ботаническим семействам, *A. spiraecola* – 511 видов растений, принадлежащих к 81 семейству, *A. solani* – 708 видов растений, принадлежащих к 80 ботаническим семействам, *B. helichrysi* – 647 видов растений, принадлежащих к 58 ботаническим семействам, *M. persicae* – 1327 видов растений, принадлежащих к 109 ботаническим семействам и *M. euphorbia* – 527 видов растений, принадлежащих к 74 ботаническим семействам. Как было сказано выше, конкретные гаплотипы COI у тлей в большей или меньшей степени соответствуют линиям тлей, ассоциированным с определенными растениями-хозяевами, в связи с чем анализируемые виды тлей должны обладать высоким уровнем внутривидового генетического полиморфизма.

Для оценки внутривидового полиморфизма у видов тлей, охваченных настоящим исследованием, проведен сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей гена COI в области с 17 по 722 нуклеотид полного гена. Оказалось, что значения парных внутривидовых генетических дистанций у тлей *A. craccivora* варьировали от 0,000 до 0,086 (со средним значением равным 0,004) и *M. persicae* (от 0,000 до 0,070, со средним значением равным 0,001) значительно различались со значениями, рассчитанными для *A. gossypii* (от 0,000 до 0,032, со средним значением равным 0,002), *A. fabae* (от 0,000 до 0,023, со средним значением равным 0,001), *B. helichrysi* (от 0,000 до 0,034, со средним значением равным 0,014), *A. spiraecola* (от 0,000 до 0,022, со средним значением равным 0,002), *M. euphorbia* (от 0,000 до 0,015, со средним значением равным 0,001) и в особенности со значениями, рассчитанными для *A. malvae* (от 0,000 до 0,004, со средним значением равным 0,001) и *A. solani* (от 0,000 до 0,009, со средним значением равным 0,002).

Число гаплотипов COI у анализируемых видов тлей значительно варьировало, в частности, у *A. craccivora* всего было выявлено 20 гаплотипов COI (со значением дивергенции равным 0,739), у *M. persicae* – 14 гаплотипов COI (со значением дивергенции равным 0,298), у *A. gossypii* – 58 гаплотипов COI (со значением дивергенции равным 0,488), у *A. fabae* – 21 гаплотипов COI (со значением дивергенции равным 0,596), у *B. helichrysi* – 12 гаплотипов COI (со значением дивергенции равным 0,789), у *A. spiraecola* – 18 гаплотипов COI (со значением дивергенции равным 0,433), у *M. euphorbia* – 20 гаплотипов COI (со значением дивергенции равным 0,662), у *A. malvae* – 2 гаплотипов COI (со значением дивергенции равным 0,206), а у *A. solani* – 9 гаплотипов COI (со значением дивергенции равным 0,266). Однако при пересчете на 100 нуклеотидных последовательностей число гаплотипов COI оказалось одинаковым у *M. euphorbia*, *A. solani* и *A. craccivora* (по 11 гаплотипов), у *A. malvae* и *A. fabae* (по 5 гаплотипов), у *M. persicae* и *A. gossypii* (по 3 гаплотипа), кроме того у *B. helichrysi* и *A. spiraecola* число гаплотипов COI на 100 последовательностей оказалось близким (у *B. helichrysi* 9 гаплотипов, а у *A. spiraecola* 8 гаплотипов). На основе полученных данных мы попробовали выявить, возможна ли разработка ПЦР-ПДРФ ключей для определения конкретных гаплотипов гена COI у рассматриваемых видов тлей.

Для каждого вида тлей в отдельности были построены рестрикционные карты с использованием всех известных ферментов рестрикции. Оказалось, что всего для последовательностей *A. craccivora* был обнаружен 31 сайт рестрикции, *M. persicae* – 30, *A. gossypii* – 26, *A. fabae* – 23, *B. helichrysi* – 17, *A. spiraecola* – 33, *M. euphorbia* – 39, *A. malvae* – 27, а у *A. solani* – 28 (рисунок 2).

По результатам анализа рестрикционных карт были выбраны ферменты рестрикции, позволяющие выявлять конкретные гаплотипы COI у каждого из анализируемых видов тлей в отдельности. В частности, для идентификации гаплотипов COI у тлей *A. craccivora* можно использовать четыре рестриктазы, *M. persicae* – четыре рестриктазы, *A. gossypii* – пять рестриктаз, *A. fabae* – две рестриктазы, *B. helichrysi* – четыре рестриктазы, *A. spiraecola* – семь рестриктаз, *M. euphorbia* – пять рестриктаз и *A. solani* – четыре рестриктазы. Для тлей *A. malvae* не было выявлено ферментов рестрикции, позволяющих выявлять конкретные гаплотипы COI.

На основе полученных данных были разработаны ПЦР-ПДРФ ключи, позволяющие выявлять конкретные гаплотипы COI у тлей *A. craccivora*, *M. persicae*, *A. gossypii*, *A. fabae*, *B. helichrysi*, *A. spiraecola*, *M. euphorbia* и *A. solani* (таблица 1).



А) *A. craccivora*; Б) *M. persicae*; В) *A. gossypii*; Г) *A. fabae*; Д) *B. helichrysi*;
Е) *A. spiraeicola*; Ё) *M. euphorbia*; Ж) *A. malvae*; И) *A. solani*

Рисунок 2. – Рестрикционные карты, построенные на основе анализа нуклеотидных последовательностей гена COI тлей-полифагов, содержащие информацию о наличии сайтов узнавания для всех ферментов рестрикции

Таблица 1. – ПЦР-ПДРФ таблица для диагностики конкретных гаплотипов у тлей-полифагов, построенная на основе анализа нуклеотидных последовательностей фрагмента гена COI

Вид	Идентифицируемые гаплотипы	Название фермента рестрикции	Сайт узнавания фермента рестрикции	Длины образующихся фрагментов
<i>Aphis craccivora</i>	2	Hpy188III	TC^NNGA	54+654 245+463
	1	MaeIII	^GTNAC	148+560
	2	BstII	CTCGAG	646+62 647+61
	1	AquIII	GAGGAG (20/18)	676+32
<i>Myzus persicae</i>	1	MunI	C^AATTG	192+516
	1	TatI	W^GTACW	473+235
	1	CviQI	G^TAC	474+234
	1	CviRI	TG^CA	318+390
<i>Aphis gossypii</i>	1	AbaI	T^GATCA	50+658
	1	HpyF3I	C^TNAG	74+634
	1	AgsI	TTS^AA	150+558
	1	CviRI	TG^CA	318+390
<i>Aphis fabae</i>	1	четырьParI	T^GATCA	553+155
	1	TaqI	T^CGA	614+94
<i>Brachycaudus helichrysi</i>	1	ParI	T^GATCA	51+657
	1	PsuI	R^GATCY	241+467
	1	BspLI	GGN^NCC	243+465
	1	MnlI	CCTC (7/6)	377+331
<i>Aphis spiraecola</i>	1	XapI	R^AATTY	439+269
	1	PsuI	R^GATCY	66+642
	2	BspPI	GGATC	74+634 633+75
	1	XapI	R^AATTY	79+629
	1	TaqI	T^CGA	89+619
	2	TsoI	TARCCA (11/9)	144+564 428+280
	1	Eam1104I	CTCTTC (1/4)	430+278
<i>Macrosiphum euphorbia</i>	1	DraI	TTT^AAA	622+86
	1	PfeI	G^AWTC	87+621
	1	Hinfl	G^ANTC	440+268
	1	FspBI	C^TAG	433+275
	1	BshNI	G^GYRCC	589+119
<i>Aulacorthum solani</i>	1	BspLI	GGN^NCC	591+117
	1	EcoRI	G^AATTC	80+628
	1	HincII	GTY^RAC	408+300
	1	MnlI	CCTC (7/6)	533+175
	1	BclI	T^GATCA	535+173

Примечание – ^ – точка разрезания молекулы ДНК

Выводы

Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей гена COI тлей-полифагов показал, что *A. craccivora*, *M. persicae*, *A. gossypii*, *A. fabae*, *B. helichrysi*, *A. spiraecola*, *M. euphorbia*, *A. malvae* и *A. solani* характеризуются высоким внутривидовым генетическим полиморфизмом. На основе полученных данных были разработаны ПЦР-ПДРФ ключи для выявления конкретных гаплотипов COI у тлей *A. craccivora*, *M. persicae*, *A. gossypii*, *A. fabae*, *B. helichrysi*, *A. spiraecola*, *M. euphorbia* и *A. solani*.

Исследования выполнены при финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (договор № Б18МВ-008).

Благодарность

Автор выражает огромную признательность заведующему кафедрой зоологии БГУ, доктору биологических наук, профессору С. В. Буге за предоставленный биологический материал, а также кандидату биологических наук ГНПО НПЦНАН Беларуси Т. П. Липинской за участие в получении результатов.

СПИСОК ОСНОВНЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Species identification of aphids (Insecta : Hemiptera : Aphididae) through DNA barcodes / R. G. Foottit [et al.] // *Molecular Ecology Resources*. – 2008. – Vol. 8, iss. 6. – P. 1189–1201.
2. Буга, С. В. Дендрофильные тли Беларуси / С. В. Буга. – Минск : БГУ, 2001. – 98 с.
3. Insect morphology and phylogeny / R. Beutel [et al.]. – Berlin : Walter de Gruyter GmbH, 2013. – 533 p.
4. Vilcinskas, A. Biology and ecology of aphids / A. Vilcinskas. – London : Taylor & Francis Group, 2016. – 282 p.
5. Aphids on the World's Plants: An online identification and information guide [Electronic resource] / Ed. R. Blackman. – London : Natural History Museum, 2012. – Mode of access: <http://www.aphidsonworldsplants.info>. – Date of access: 25.03.2018.
6. Anstead, J. A. Mitochondrial DNA sequence divergence among *Schizaphis graminum* (Hemiptera: Aphididae) clones from cultivated and non-cultivated hosts: haplotype and host associations / J. A. Anstead, J. D. Burd, K. A. Shufran // *Bulletin of Entomological Research*. – 2002. – Vol. 92, № 1. – P. 17–24.
7. Large-scale phylogeographic study of the cosmopolitan aphid pest *Brachycaudus helichrysi* reveal shost plant associated lineages that evolved in allopatry / M. Popkin [et al.] // *Biological Journal of the Linnean Society*. – 2017. – Vol. 120, № 1. – P. 102–114.
8. BOLD Systems v4 [Электронный ресурс] / BOLD Systems v4. – Ontario, 2017. – Режим доступа: <http://www.barcodinglife.org/index.php/TaxBrowser/Home>. – Дата доступа: 25.03.2018.
9. GenBank Overview [Electronic resource] / GenBank Overview. – USA, 2017. – Mode of access: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>. – Date of access: 25.03.2018.
10. Holman, J. Host plant catalog of aphids. Palearctic region / J. Holman. – Berlin : Springer Science, 2009. – 1216 p.

Поступила в редакцию 18.07.2018

E-mail: masch.89@mail.ru

M. M. Varabyova

DETECTION OF HAPLOTYPES POLYPHAGOUS SPECIES OF APHIDS OF PCR-RFLP ANALYSIS METHOD

The 1779 nucleotide sequences of the COI gene from *Acyrtosiphon malvae* Kalt., *Aphis craccivora* Koch, *Aphis fabae* Scop., *Aphis gossypii* Glov., *Aphis spiraecola* Patch, *Aulacorthum solani* (Kalt.), *Brachycaudus helichrysi* Kalt., *Myzus persicae* (Sulz.) and *Macrosiphum euphorbia* Thorn were analyzed. The results of the analysis indicated aphids-polyphagous possess a high captive polymorphism COI gene. On the basis of the obtained data the restriction maps were constructed and the PCR-RFLP keys were created to identify some haplotypes of COI genes the polyphagous species of aphids.

Keywords: polyphagous species, restriction maps, PCR-RFLP keys, *A. malvae*, *A. craccivora*, *A. fabae*, *A. gossypii*, *A. spiraecola*, *A. solani*, *B. helichrysi*, *M. persicae* and *M. euphorbia*.