

**ПЦР-ПДРФ ТАБЛИЦЫ ДЛЯ КОРРЕКТНОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ
ТРУДНОДИФФЕРЕНЦИРУЕМЫХ ВИДОВ ТЛЕЙ –
ВРЕДИТЕЛЕЙ СЕМЕЧКОВЫХ КУЛЬТУР**

М.М. Воробьева, Н.В. Воронова, С.В. Буга

Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь

e-mail: masch.89@mail.ru

Введение

В настоящее время в Центральный Европе, в частности, в Беларуси в структуре плодовых насаждений исключительное место занимают посадки яблони, что определяет актуальность и практическую значимость изучения фитофагов – вредителей семечковых культур [1]. В составе комплекса вредителей яблони в условиях Беларуси присутствует ряд видов тлей, которые также выступают в качестве переносчиков вирусных заболеваний плодовых культур [2]. К настоящему времени известен таксономический состав тлей – вредителей яблони в Беларуси [3], в числе которых *Eriosoma lanigerum* (Hausmann), *Rhopalosiphum oxyacanthae* Schrank, syn. *Rh. insertum* Walker, *Aphis spiraecola* Patch, *Dysaphis anthrisci* Börner, *Dysaphis radicola* Mordvilko, *Aphis pomi* de Geer и *Dysaphis plantaginea* Passerini. Из них последние два вида с Постановлением Министерства сельского хозяйства и продовольствия Республики Беларусь № 29 от 17.10.2016 г. внесены в «Перечень особо опасных вредителей, болезней растений и сорняков» [4].

Красная кровяная тля (*E. lanigerum*) вредит яблоне в сопредельной Польше и может завозиться с импортируемыми из стран Европы саженцами яблони. Этот вид тлей является опасным вредителем яблони, поскольку в местах питания насекомых у основания почек, на плодушках и т.д. образуются изъязвления, служащие также «воротами» для инфицирования растений. В умеренной зоне Европы вид анголоцикличен ввиду отсутствия первичного растения-хозяина – американского вяза (*Ulmus americana* L.) [5].

Яблонно-злаковая тля (*Rh. oxyacanthae*) принадлежит к числу фоновых в условиях Беларуси форм. Данный вид двудомен, тли осуществляют миграцию с семечковых розоцветных на злаки. На первичных кормовых растениях (*Malus* spp. и др.) яблонно-злаковая тля регистрируется только в весенний и осенний периоды, в связи с чем характеризуется сравнительно низким уровнем вредоносности [3, 6, 7].

Тли рода *Dysaphis* Börner, а именно яблонно-подорожниковая тля (*D. plantaginea*) и яблонные красногалловые *D. radicola* и *D. anthrisci* также повреждают яблони. Питание красногалловых тлей обуславливает покраснение, скручивание и иные деформации листьев и молодых растущих побегов, ведет к их отмиранию [8, 9]. Для указанных видов характерен двудомный биологический цикл. В частности, у *D. radicola* миграция осуществляется на щавель (*Rumex* spp.), у *D. anthrisci* – на купырь лесной (*Anthriscus sylvestris* Hoffm.), а у *D. plantaginea* – на подорожники (*Plantago* spp.) [10]. При этом раньше всего (в мае – начале июня) она осуществляется у *D. anthrisci*, затем – у *D. radicola*, тогда как у *D. plantaginea* миграция может иметь факультативный характер, и при благоприятных условиях колонии могут поддерживать существование на яблонях длительное время [11, 12]. Последнее обстоятельство, а также многочисленность этих тлей обуславливают высокий уровень вредоносности яблонно-подорожниковой тли, особенно в средневозрастных садовых насаждениях.

Зеленая яблонная тля (*A. pomi*) способна развивается на многих Rosaceae из секции Pomoidea и Spiraeoidea. В садовых насаждениях вредит яблоне (*Malus*), груше (*Pyrus*), айве (*Cydonia*), рябине (*Sorbus*), а также использует в качестве кормовых растений декоративные деревья и кустарники, такие как спиреи, (*Spiraea* spp.), кизильники (*Cotoneaster* spp.), боярышники (*Crataegus* spp.) и другие розоцветные [13]. В Беларуси это основной вредитель

яблони в питомниках. Биологический цикл однодомный, в течение вегетационного сезона, развитие тлей происходит на древесных розоцветных без чередования первичных и вторичных хозяев [14].

Зеленая цитрусовая тля (*A. spiraecola*) принадлежит к числу основных вредителей яблони и цитрусовых плодовых культур, а также к числу эффективных переносчиков вирусных заболеваний растений [15]. Характерным является образование на яблоне смешанных колоний *A. pomi* и *A. spiraecola*, дифференциация которых по признакам морфологии (включая морфометрию) не эффективна [16]. Таким образом, существуют затруднения в идентификации труднодифференцируемых видов тлей, прежде всего, представителей рода *Aphis* L., а также *Dysaphis*, различающихся по уровню вредоносности, а также эффективности переноса вирусов. Так как корректная видовая диагностика является неотъемлемой частью мониторинга видового состава, возникает необходимость в разработке методов и подходов, позволяющих решать такого рода задачи. Ранее проведенные нами исследования на образцах *A. pomi* / *A. spiraecola*, коллектированных с разных растений в Беларуси, показали, что наиболее эффективным методом идентификации труднодифференцируемых видов тлей и выявления среди них карантинных объектов является определение по диагностическим таблицам, построенным на основе анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ) [17]. В этой связи, в рамках настоящего исследования, было принято решение построить рестрикционные карты и создать ПЦР-ПДРФ таблицы для идентификации видов тлей, принадлежащих к числу вредителей яблони.

Методы исследования

Нуклеотидные последовательности гена субъединицы 1 цитохром-с-оксидазы (COI) анализируемых видов тлей получены из базы данных BOLD (www.barcodinglife.com). Всего было проанализировано 66 последовательности гена COI, среди которых 22 *D. plantaginea* (Канада, Франция, Германия, США, Беларусь), 1 – *D. anthrisci* (Беларусь), 9 – *D. radicola* (Франция, Германия, Греция), 26 – *E. lanigerum* (Франция) и 8 – *Rh. oxyacanthae* (Франция, Германия, Новая Зеландия).

В программе MEGA7 провели множественное выравнивание нуклеотидных последовательностей гена COI для каждого вида тлей в отдельности. Поиск сайтов рестрикции в анализируемых последовательностях COI осуществили с использованием программы BioEdit. Графические рестрикционные карты строили в программе pDRAW32 1.1.112 с использованием всех известных ферментов рестрикции и их изошизомеров. ПЦР-ПДРФ таблицы создавали по результатам анализа построенных рестрикционных карт.

Результаты и обсуждение

В результате работы для последовательностей *D. plantaginea* было обнаружено 150 сайтов рестрикции, *D. radicola* – 144, *D. anthrisci* – 70, *E. lanigerum* – 175 и *Rh. oxyacanthae* – 132. При построении рестрикционных карт все изошизомеры были исключены, в этой связи оказалось, что в последовательностях *D. plantaginea* обнаруживаются сайты рестрикции для 37 рестриктаз, *D. radicola* – для 44 рестриктаз, *D. anthrisci* – для 24 рестриктаз (рисунок 1).

На основе нуклеотидных последовательностей гена COI *E. lanigerum* и *Rh. oxyacanthae* были построены рестрикционные карты, представленные на рисунке 2. С учетом всех изошизомеров оказалось, что в последовательностях *E. lanigerum* обнаруживаются сайты рестрикции для 39 рестриктаз, а в последовательностях *Rh. oxyacanthae* – для 35 рестриктаз.

Сравнительный анализ рестрикционных карт позволил нам выявить один фермент (AciI) для *D. plantaginea* и три – для *D. radicola* (MnII, TaiI и TspGWI), которые имели сайт узнавания в последовательностях только одного вида. Кроме того была отмечена одна рестриктаза (AlwI), которая имела сайт узнавания в последовательностях *D. plantaginea* и *D. radicola* и не имела – в последовательностях *D. anthrisci*.

Рестриктазы EarI и BsaVI имеют сайты узнавания только в последовательностях *E. lanigerum*, поэтому их можно использовать для диагностики данного вида тлей, кроме того

были отмечены две эндонуклеазы (SmlI и BfaI), позволяющие выявлять различные гаплотипы у кровяной тли.

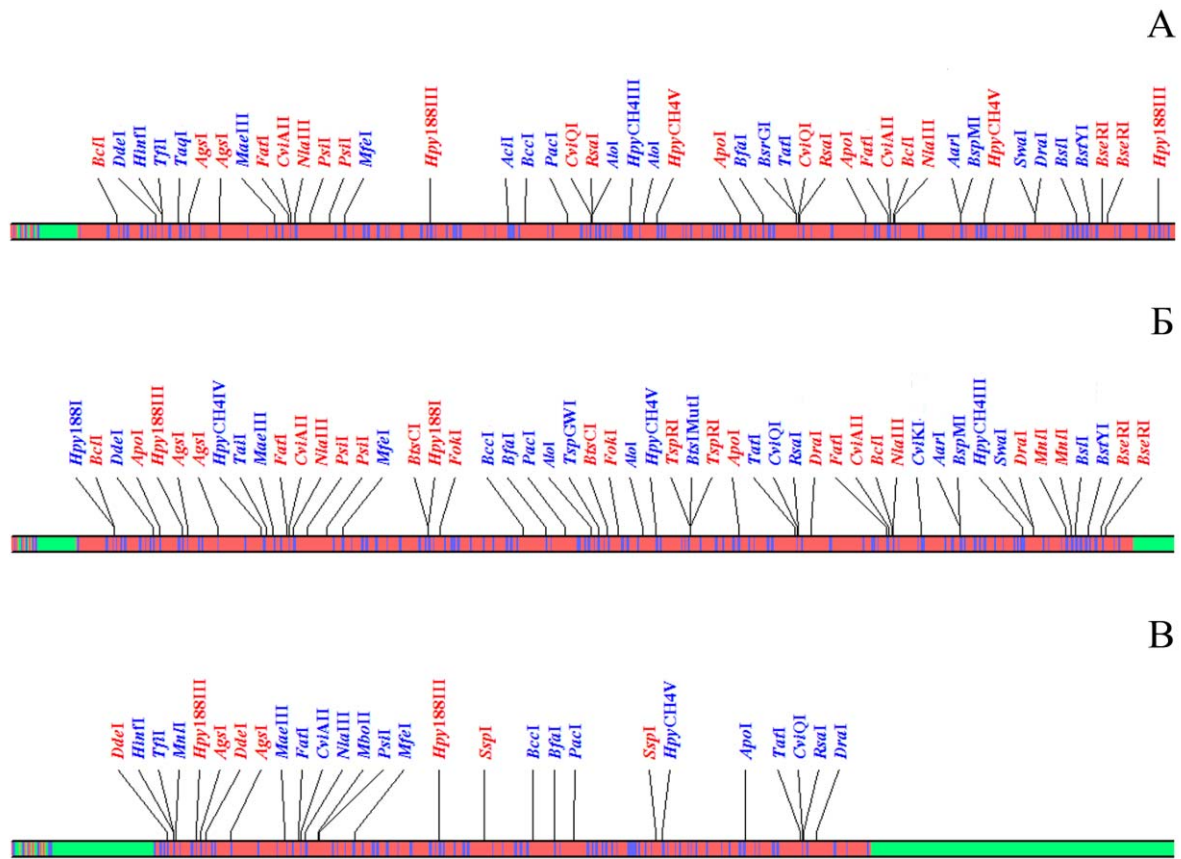


Рисунок 1 – Рестрикционные карты фрагмента COI тлей *Dysaphis plantaginea* (А), *Dysaphis radicola* (Б) и *Dysaphis anthrisci* (В), содержащие информацию о наличии сайтов узнавания для ферментов рестрикции

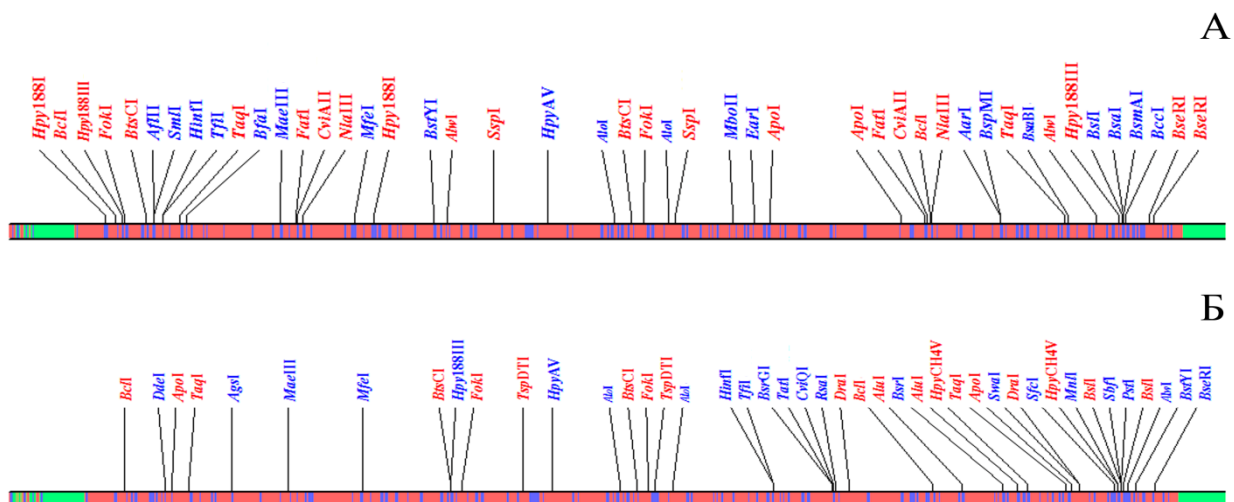


Рисунок 2 – Рестрикционные карты фрагмента COI тлей *Eriosoma lanigerum* (А) и *Rhopalosiphum oxyacanthae* (Б), содержащие информацию о наличии сайтов узнавания для ферментов рестрикции

Мы обнаружили, что для диагностики *Rh. oxyacanthae* можно использовать четыре рестриктазы, среди которых SfeI, SbfI и PstI имеет сайт узнавания только в последовательностях *Rh. oxyacanthae*, а MnlI в последовательностях *Rh. oxyacanthae* и *D. radicola*. Для альтернативной видовой идентификации яблоневых вредителей можно использовать рестриктазы, представленные в таблице 1, при этом фермент рестрикции должен иметь сайт узнавания в последовательности только одного вида.

Таблица 1 – Идентификационная ПЦР-ПДФ таблица для диагностики видов тлей – вредителей яблони, построенная на основе анализа нуклеотидных последовательностей гена COI

Фермент рестрикции	Сайт узнавания	Длина образующихся фрагментов				
		<i>Dysaphis plantaginea</i>	<i>Dysaphis radicola</i>	<i>Dysaphis anthrisci</i>	<i>Eriosoma lanigerum</i>	<i>Rhopalosiphum oxyacanthae</i>
SfeI	C^TRYAG	–	–	–	–	641+66
SbfI	CCTGCA^GG	–	–	–	–	640+67
PstI	CTGCA^G	–	–	–	–	641+66
SmlI	C^TYRAG	–	–	–	72+635	–
AlwI	GGATC	64+643	64+643	–	238+469	–
EarI	CTCTTC	–	–	–	422+285	–
BsaBI	GATNN^NNATC	–	–	–	610+97	–
AccI	CCGC	292+415	–	–	–	–
PacI	TTAAT^TAA	325+382	325+382	325+382	–	–
RsaI	GT^AC	473+234	473+234	473+234	–	473+234
BfaI	C^TAG	451+256	317+390	317+390	91+616	–
MnlI	CCTC	–	626+81	–	–	626+81
TatI	W^GTACW	472+235	472+235	472+235	–	472+235
TaiI	ACGT^	–	140+567	–	–	–
TspGI	ACGGA	–	335+372	–	–	–
FatI	^CATG	157+550	157+550	157+550	–	157+550
CviAI	C^ATG	157+550	157+550	157+550	–	157+550

Этот метод позволяет с высокой точностью идентифицировать труднодифференцируемые по морфологическим признакам виды тлей *D. plantaginea*, *D. radicola*, *D. anthrisci*, а также идентифицировать тлей *E. lanigerum* и *Rh. oxyacanthae* на разных стадиях жизненного цикла, представляющих собой на сегодняшний день серьезную угрозу яблоне в садовых насаждениях.

Выводы

В рамках настоящего исследования построены рестрикционные карты и разработаны ПЦР-ПДФ ключи для диагностики труднодифференцированных видов тлей рода *Dysaphis*, а также *E. lanigerum* и *Rh. oxyacanthae*, принадлежащих к числу вредителей яблони. Полученные результаты свидетельствуют о том, что метод ПЦР-ПДФ-анализа может быть использован для идентификации видов тлей, представляющих угрозу семечковым плодовым культурам в условиях Беларуси и сопредельных стран.

Список литературы

1. Колтун, Н.Е. Защита молодых насаждений и питомников семечковых культур от вредных организмов / Н.Е. Колтун, В.С. Комардина; Институт защиты растений. – Минск : Институт системных исследований в АПК НАН Беларуси, 2014. – 64 с.
2. Амбросов, А.Л. Как защитить сад от вредителей и болезней / А.Л. Амбросов, В.В. Болотникова, О.С. Мерцалова. – Минск : Урожай, 1985. – 160 с.

3. Буга, С.В. Тли (Homoptera : Aphidinea) – вредители традиционных плодовых культур в условиях Беларуси : современное состояние и тенденции изменения состава и вредоносности / С.В. Буга, Н.В. Воронова, Ф.В. Сауткин // Плодоводство и ягодоводство России. – 2013. – Т. 36, № 1. – С. 64–69.

4. Постановление Министерства сельского хозяйства и продовольствия Республики Беларусь № 29 от 17.10.2016 г. внесены в «Перечень особо опасных вредителей, болезней растений и сорняков» [Электронный ресурс] / Министерства сельского хозяйства и продовольствия Республики Беларусь. – Минск, 2016. – Режим доступа: http://www.ggiskzr.by/doc/.../osobo_opasnye_vred_17_10_16.doc/. – Дата доступа: 29.03.2017.

5. Мордвилко, А.К. Кровяная тля (*Eriosoma lanigerum* (Hausmann)). Биология и распространение / А.К. Мордвилко. – Л. ; М. : Новая деревня, 1924. – 109 с.

6. Рупайс, А.А. Тли Латвии / А.А. Рупайс. – Рига : Зинатне, 1989. – 331 с.

7. Rakauskas, R. Orchard aphids (Hemiptera : Sternorrhyncha, Aphidoidea) of Lithuania : a century of research / R. Rakauskas // Polish Journal of Entomology. – 2015. – Vol. 84. – P. 311–323.

8. Попова, А.А. Типы приспособлений тлей к питанию на кормовых растениях / А.А. Попова. – Л. : Наука, 1967. – 292 с.

9. Плодовые культуры / Н.Е. Колтун [и др.] // Интегрированные системы защиты сельскохозяйственных культур от вредителей, болезней и сорняков. – Минск, 2005. – С. 371–417.

10. Шапошников, Г.Х. Подотряд Aphidinea – Тли / Г.Х. Шапошников // Определитель насекомых европейской части СССР / под. ред. Бей-Биенко. – М. ; Л. : 1964–1988. – Т. 1 : Низшие, древнекрылые, с неполным превращением / Г.Я. Бей-Биенко [и др.]. – М.; Л.: Наука, 1964. – С. 489–616.

11. Lubiartz, M. The process of aphid egg-laying and the little known role of the Coccinellidae in aphid egg destruction in Poland – preliminary results / M. Lubiartz, E. Cichocka // Journal of Plant Protection Research. – 2014. – Vol. 54, n. 3. – P. 242–249.

12. Evaluation of resistance in seven apple cultivars to rosy apple aphid, *Dysaphis plantaginea* (Hemiptera : Aphididae) under greenhouse and field conditions / J. Razmjou [et al.] // J. Crop Prot. – 2014. – Vol. 3, n. 2. – P. 173–180.

13. Holman, J. Host plant catalog of aphids. Palaearctic region / J. Holman. – Berlin : Springer, 2009. – 1216 p.

14. Колтун, Н.Е. Биоэкологическое обоснование мероприятий по защите питомников яблони от зеленой яблонной (*Aphis pomi* de Geer) в Беларуси : автореф. дис. ...канд. биол. биол. наук : 06.01.11 / Н.Е. Колтун ; РУП «Институт защиты растений». – Прилуки, 1991. – 21 с.

15. Rakauskas, R. *Aphis pomi* and *Aphis spiraecola* (Hemiptera : Sternorrhyncha : Aphididae) in Europe – new information on their distribution, molecular and morphological peculiarities / R. Rakauskas, J. Bašilova, R. Bernotienė // Eur. J. Entomol. – 2015. – Vol. 112, n. 2. – P. 270–280.

16. Identification, distribution, and molecular characterization of the apple aphids *Aphis pomi* and *Aphis spiraecola* (Hemiptera : Aphididae : Aphidinae) / R.G. Footitt [et al.] // Can. Entomol. – 2009. – Vol. 141. – P. 478–495.

17. Воронова, Н.В. Применимость метода ПЦР-ПДРФ анализа баркодинг-региона COI для идентификации инвазивных видов насекомых в фауне Беларуси (на примере тлей рода *Aphis* L.) / Н.В. Воронова, М.М. Воробьева, Д.Г. Жоров, С.В. Буга // Молекулярная и прикладная генетика. – 2016. – Т. 21. – С. 64–70.

**PCR-RELP TABLES FOR CORRECT IDENTIFICATION OF HARD
TO DIFFERENTIATE TYPES OF APHIDS OF PESTS
OF POMOIDEA HORTICULTURE**

M.M. Varabyova, N.V. Voronova, S.V. Buga

Belarusian State University, Minsk, Belarus

e-mail: masch.89@mail.ru

Aphis pomi, *A. spiraecola*, *Dysaphis anthrisci*, *D. plantaginea*, *D. radicola*, *Eriosoma lanigerum* and *Rhopalosiphum oxyacanthae* are the most important pests of apple in central Europe, therefore their precise species identification is an important task. We have performed a comparative analysis of the nucleotide sequences of the gene of the 1 cytochrome c oxidase subunit of the listed aphid species. On the bases of the data recieved, restriction maps were constructed and PCR-RFLP tables were created for precise species diagnostics of apple-tree pests on the territory of Belarus and neighboring countries.