

ГРУППЫ НЕСТАБИЛЬНОСТИ ДЛЯ ЦИТОХРОМОВ P450 ТЛИ *MACROSIPHUM ROSAE* – ВРЕДИТЕЛЯ ШИПОВНИКА И ДЕКОРАТИВНОЙ РОЗЫ

Н.В. Воронова, Р.С. Шулинский, В.В. Гричик, А.М. Шульгович
Белорусский государственный университет, Минск

Тли являются важными сельскохозяйственными вредителями, а также биологическими моделями для изучения взаимодействия насекомых и растений, переноса вирусов и причин развития их фенотипической пластичности.

Тли отличаются способностью к быстрой адаптации к различным видам инсектицидов. Первыми в борьбу с токсичными вторичными метаболитами растений и инсектицидами вступают цитохромы P450. Они отвечают за превращение неполярных, жирорастворимых соединений в более полярные и водорастворимые метаболиты путём присоединения одного атома кислорода из молекулы O₂ в молекуле субстрата [1]. С генетической точки зрения адаптивные способности тлей выражаются благодаря увеличению копий генов системы детоксикации, и за счёт того, что копии генов становятся уникальными для конкретного метаболита.

Чтобы разработать качественные методы избирательного контроля численности популяции тлей, необходимо, прежде всего, на молекулярном уровне идентифицировать те семейства генов, которые отвечают за приспособление и устойчивость, и проводить дальнейший их анализ (филогенетический, эволюционный).

В первую очередь была проведена структурная и функциональная аннотация генома тли *Macrosiphum rosae*. Затем проводилась идентификация доменов P450 в полученных моделях генов системы детоксикации с помощью программы Interproscan и интерпретированного языка программирования Python, т.е. из полной аннотации были извлечены гены цитохромов P450.

Каждый цитохром, обнаруженный в геноме *M. rosae*, был прокурирован в геномном браузере Apollo. А именно была подобрана наиболее подходящая модель гена, скорректированы границы экзонов (обнаружены старт– и стоп–кодоны), найдены канонические сайты сплайсинга. Далее была произведена количественная характеристика генов из этого семейства.

Для дальнейшей работы с цитохромами P450, а именно анализа групп нестабильности, было необходимо привести их к единой номенклатуре по Нельсону. Такая необходимость есть, т.к. классификация NCBI характеризуется избыточностью и не отражает ортологичность и ход эволюции [2].

С помощью программы CD-HIT исследуемые цитохромы P450 *M. rosae* были кластеризованы с пулом последовательностей, состоящим из уже классифицированных цитохромов P450 у других видов тлей. Образование кластера происходило при условии идентичности последовательностей не менее, чем на 90 %.

Для проверки правильности результатов CD-HIT и дальнейшего поиска групп нестабильности был проведен филогенетический анализ классифицированных последовательностей *M. rosae* с цитохромами P450 из генома *Aphis craccivora*, собранного ранее, и 8 сборок геномов, взятых из базы данных RefSeq NCBI.

Для поиска групп нестабильности были использованы последовательности цитохромов следующих видов: *M. rosae*, *A. craccivora*, *Aphis gossypii*, *Diuraphis noxia*, *Myzus persicae*, *Melanaphis sachari*, *Rhopalosiphum maidis*, *Acyrtosiphon pisum*. Ранее полученный файл с филогенетическим деревом цитохромов P450 этих видов вместе с информационным файлом был процессирован в программе MiPhy.

По результатам аннотации генома тли *M. rosae* было обнаружено 10 генов CYP380, 9 генов CYP4, 20 генов CYP6 — цитохромов P450, относящихся к системе детоксикации.

Далее гены были классифицированы по номенклатуре Нельсона. Затем были построены филогенетические деревья для семейств из клады 2 (CYP4 и CYP380) и клады 3 (CYP6). На филогенетических деревьях все названные по общепринятой классификации Нельсона цитохромы P450 *M. rosae* были кластеризованы со своими ортологами, что подтверждает результаты работы CD-HIT.

Дубликации в геноме *M. rosae* претерпели следующие ортологи семейств из клады 2: CYP4CJ5, CYP380C6, CYP380C7.

Среди цитохромов P450 клады 3 дубликации наблюдаются у следующих ортологов: CYP6DA1, CYP6CY15, CYP6CY16, CYP6CY9.

В ходе анализа групп нестабильности были получены кластеры с последовательностями, имеющими самые высокие значения нестабильности.

Для семейств CYP4 и CYP380 были выделены 2 группы цитохромов с самыми высокими значениями нестабильности. К первой группе относятся последовательности: CYP380C2, CYP380C1, CYP380C3, CYP380C34, CYP380C35, CYP380C30, CYP380C31, CYP380C19. Ко второй группе нестабильности относятся: CYP380C47, CYP380C9, CYP380C8, CYP380C7 (рис. 1).

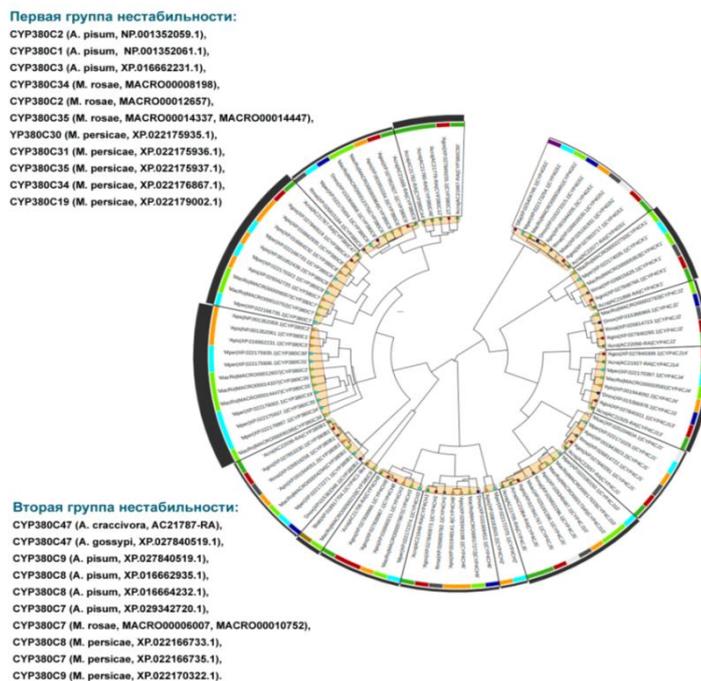


Рисунок 1. – Группы нестабильности семейств CYP380 и CYP4

Для семейства CYP6 была выделена одна группа нестабильности. К самым нестабильным последовательностям из этого семейства относятся: CYP6CY55, CYP6CY48, CYP6CY51, CYP6CY56, CYP6CY20, CYP6CY34, CYP6CY6, CYP6CY33, CYP6CY34, CYP6CY4, CYP6CY2, CYP6CY3, CYP6CY23 (рис. 2).

Ген CYP4CJ5 отвечает за устойчивость к пиретроидам и наличие у него паралога соотносится с данными о том, что инсектициды на основе синтетических пиретроидов лишь умеренно токсичны по отношению к *M. rosae* [3].

По имеющимся данным, гены CYP6DA1 и CYP6CY9, у которых наблюдаются дубликации в геноме *M. Rosae*, связаны с детоксикацией тиаметоксама [4]. Однако, отсутствуют свидетельства того, что *M. rosae* вырабатывала какую-либо устойчивость к данному инсектициду.

Среди последовательностей CYP380 и CYP4, к группам с самой высокой нестабильностью относится семейство CYP380, что объясняется тем, что у тлей при применении инсектицидов на основе сульфосафлора наблюдается сверхэкспрессия генов из семейства CYP380 [5], а эта группа инсектицидов в настоящее время активно применяется в сельском хозяйстве. Наблюдаемая нестабильность этого семейства подтверждает происходящую эволюционную адаптацию к данному виду инсектицидов.

Группа нестабильности:

CYP6CY55 (*A. craccivora*, AC21525-RA),
CYP6CY48 (*A. craccivora*, AC21818-RA),
CYP6CY51 (*A. craccivora*, AC21947-RA),
CYP6CY56 (*A. craccivora*, AC21957-RA),
CYP6CY20 (*A. craccivora*, AC21958-RA),
CYP6CY51 (*A. gossypii*, XP.027848818.1),
CYP6CY20 (*A. gossypii*, XP.027851731.1),
CYP6CY48 (*A. gossypii*, XP.027854113.1),
CYP6CY34 (*A. pisum*, XP.001943570.2),
CYP6CY33 (*A. pisum*, XP.001948443.2, XP.029344137.1),
CYP6CY4 (*A. pisum*, XP.001948581.2),
CYP6CY6 (*A. Pisum*, XP.008183473.1),
CYP6CY2 (*A. pisum*, XP.029344135.1),
CYP6CY34 (*A. pisum*, XP.001943570.2),
CYP6CY6 (*M. rosae*, MACRO00015739),
CYP6CY4 (*M. rosae*, MACRO00016671),
CYP6CY3 (*M. rosae*, MACRO00021634),
CYP6CY23 (*M. persicae*, XP.022162044.1),
CYP6CY3 (*M. persicae*, XP.022162047.1)

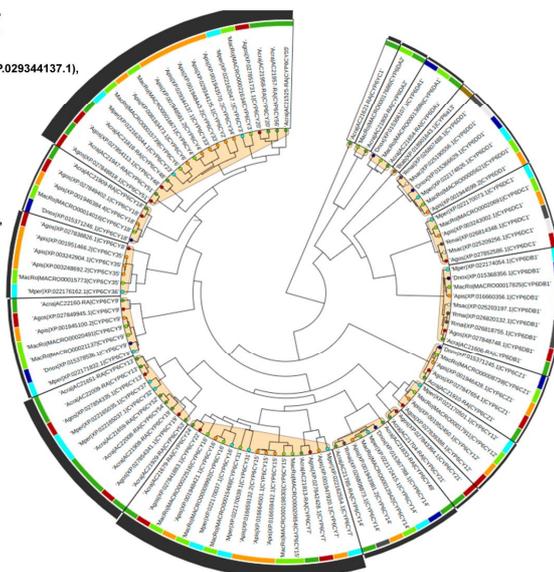


Рисунок 2. – Группы нестабильности семейства CYP6

К самым нестабильным последовательностям из семейства CYP6 были отнесены гены CYP6CY3, CYP6CY6, CYP6CY9, которые непосредственно относятся к детоксикации неоникотиноидов [6].

Подготовлено при финансовой поддержке БРФФИ и МИРРУ

Список использованных источников

1. Guengerich, F.P. Mechanisms of Cytochrome P450–Catalyzed Oxidations / F.P. Guengerich // ACS Catal. – 2018. – Vol. 8, № 12. – P. 10964–10976.
2. Nelson, D.R. Cytochrome P450 Nomenclature, 2004 / D.R. Nelson // Cytochrome P450 Protocols / DOI: 10.1385/1–59259–998–2:1. – New Jersey: Humana Press, 2005. – Vol. 320. – P. 1–10.
3. Functional analysis of cytochrome P450 genes linked with acetamiprid resistance in melon aphid, *Aphis gossypii* / F. Ullah [et al.] // Pesticide Biochemistry and Physiology. – 2020. – Vol. 170 – P. 104687.
4. Mutations in the nAChR β 1 subunit and overexpression of P450 genes are associated with high resistance to thiamethoxam in melon aphid, *Aphis gossypii* Glover / H. Zhang [et al.] // Comparative Biochemistry and Physiology. – 2022. – Vol. 258. . – P. 110682.
5. Overexpression of UDP–glucuronosyltransferase and cytochrome P450 enzymes confers resistance to sulfoxaflor in field populations of the aphid, *Myzus persicae* / A. Pym [et al.] // Insect Biochemistry and Molecular Biology. – 2022. – Vol. 143 – P. 103743.
6. Amplification of a Cytochrome P450 Gene Is Associated with Resistance to Neonicotinoid Insecticides in the Aphid *Myzus persicae* / A.M. Puinean [et al.] // PLoS Genet. – 2010. – Vol. 6, № 6. – P. 1000999.
7. MIPhy: identify and quantify rapidly evolving members of large gene families / DM. Curran [et al.] // PeerJ. – 2018.