

УДК 595.752.2(476)

**М.М. ВОРОБЬЁВА**, канд. биол. наук, доцент,  
заведующая кафедрой биотехнологии  
Полесский государственный университет,  
г. Пинск, Республика Беларусь

**Д.Г. ЖОРОВ**, канд. биол. наук, доцент,  
заместитель начальника ГУН-начальник отдела аспирантуры и докторантуры  
Белорусский государственный университет,  
г. Минск, Республика Беларусь

Статья поступила 9.04.2025

## **МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К ДИАГНОСТИКЕ ТЛЕЙ РОДА *BRACHYCAUDUS*, ОБРАЗУЮЩИХ СМЕШАННЫЕ КОЛОНИИ НА РАСТЕНИЯХ РОДА *PRUNUS* В БЕЛАРУСИ**

*Для тлей *B. divaricatae* и *B. prunicola* рецессивной фауны Беларуси расшифрованы нуклеотидные последовательности фрагмента гена COI.*

*Рестрикционные карты построены для тлей *B. prunicola*, *B. divaricatae* и *B. cardui* с учетом всех выявленных гаплотипов COI.*

*Отобраны 4 фермента рестрикции для выявления *B. prunicola*, 1 фермент – для *B. divaricatae* и 1 фермент – для *B. cardui*. Выявлены 2 фермента, которые разрезали только нуклеотидные последовательности фрагмента гена COI тлей *B. divaricatae* и не разрезали нуклеотидные последовательности фрагмента гена COI тлей *B. cardui* и *B. prunicola*.*

**Ключевые слова:** *B. divaricatae*, *B. cardui*, *B. prunicola*, COI, ферменты рестрикции.

**VARABYOVA M.M.**, PhD in Biol. Sc., Associate Professor,  
Head of the Department of Biotechnology  
Polessky State University, Pinsk, Republic of Belarus

**ZHOROV D.G.**, PhD in Biol. Sc., Associate Professor,  
Deputy Head of the Main Directorate of Science-Head of the Postgraduate and Doctoral Studies  
Belarusian State University, Minsk, Republic of Belarus

## **MOLECULAR GENETIC APPROACHES TO DIAGNOSTICS OF APHIDS OF THE GENUS *BRACHYCAUDUS*, FORMING MIXED COLONIES ON PLANTS OF THE GENUS *PRUNUS* IN BELARUS**

*Nucleotide sequences of the COI gene fragment were deciphered for the aphids *B. divaricatae* and *B. prunicola* of the fauna of Belarus.*

*Restriction maps were constructed for aphids for *B. prunicola*, *B. divaricatae* and *B. cardui* taking into account all identified COI haplotypes.*

*4 restriction enzymes were selected to detect *B. prunicola*, 1 enzyme for *B. divaricatae* and 1 enzyme for *B. cardui*. 2 enzymes were identified that cut only the nucleotide sequences of the COI gene fragment of the aphids *B. divaricatae* and did not cut the nucleotide sequences of the COI gene fragment of the aphids *B. cardui* and *B. prunicola*.*

**Keywords:** *B. divaricatae*, *B. cardui*, *B. prunicola*, COI, restriction enzymes.

**Введение.** Тли (Rhynchota: Sternorrhyncha: Aphidina) – таксон насекомых, насчитывающий более 5000 видов-вредителей декоративных, плодово-ягодных, сельскохозяйственных и иных культур [1]. Их сложный жизненный цикл, тесная связь с растениями-хозяевами, способность адаптироваться к неблагоприятным условиям окружающей среды, полифенизм, а также способность размножаться как партеногенетически, так и амфиγονически, делают тлей идеальной моделью для изучения актуальных вопросов экологии и биологии [2].

Согласно современным подходам к классификации Aphididae были разделены на несколько триб, подтриб и родов, определение которых постепенно продолжает изменяться. Часть исследователей придерживаются таксономических методов, однако на таких уровнях они неоднозначны, поскольку возникают трудности при работе со скрытыми морфологическими различиями между видами. В последнее время многие вовлекают в классификацию молекулярно-генетические и филогенетические подходы, тем не менее эти исследования сосредоточены на внутривидовых отношениях и филогении на уровне видов [2].

Род *Brachycaudus* van der Goot, 1913 представляет собой один из тех случаев, когда таксономическая классификация является предметом обсуждения. Он насчитывает около 50 видов короткохвостых тлей, распространенных в основном в Палеарктическом регионе [1]. Внешне партеногенетические самки мелкие от 0,7 до 2,6 мм в длину с зеленым, темно-зелеными или охристо-красноватым цветом тела. Усики короче тела. У бескрылых самок рода *Brachycaudus* брюшная сторона по-разному склеротизирована, но часто имеет темный склеротический щиток. Трубочки короткие, почти гладкие, цилиндрические. Хвостик шлемовидный [3].

В рецентной фауне Беларуси род *Brachycaudus* представлен 10 видами дендрофильных и гербофильных тлей: *Brachycaudus helichrysi* (Kaltenbach, 1843), *Brachycaudus spiraeae* (Börner, 1932), *Brachycaudus (Acaudus) divaricatae* (Shaposhnikov, 1956), *Brachycaudus (Acaudus) lychnidis* (Linnaeus, 1758), *Brachycaudus (Appelia) prunicola* (Kaltenbach, 1843),

*Brachycaudus (Appelia) tragopogonis* (Kaltenbach, 1843), *Brachycaudus (Brachycaudina) aconiti* (Mordvilko, 1928), *Brachycaudus (Prunaphis) cardui* (Linnaeus, 1758) и *Brachycaudus (Prunaphis) mordvilkoii* Hille Ris Lambers, 1931 [4]. Из них, тли *B. spiraeae*, *B. prunicola* и *B. divaricatae* принадлежат к числу чужеродных инвазивных видов [5]. Последний включен в Черную книгу инвазивных видов животных Беларуси [6].

В условиях Беларуси тли *B. divaricatae*, *B. prunicola* и *B. cardui* образуют контаминированные (смешанные) колонии и ощутимо вредят *Prunus* sp. в декоративных и садовых насаждениях [7].

Алычево-дремовая тля (*B. divaricatae*) в условиях Беларуси характеризуется голоциклическим сокращенно однодомным биологическим циклом с зимовкой на стадии яйца [8]. Трофически связана с алычой, или сливой растопыренной (*Prunus divaricate* Ledeb. (syn *Prunus cerasifera* Ehrh.)). *B. divaricatae* является открытоживущим видом, принадлежащим к дендрохортобионтной фитобионтной группе. Тли формируют плотные или разреженные колонии на нижней стороне листовых пластинок и (или) вершинах растущих побегов, что позволяет отнести их к числу листопобеговых меристемофильных форм. Колонизированные побеги замедляют рост и в дальнейшем отмирают. Листовые пластинки в результате питания фитофага подвергаются неупорядоченную деформации и хлоротизации.

Полосатая сливовая тля (*B. prunicola*) в условиях Беларуси характеризуется голоциклическим двудомным биологическим циклом с зимовкой на стадии яйца. Основным по значимости первичным растением-хозяином является слива домашняя (*Prunus domestica* L.) [8], а также иные представители рода *Prunus* sp., а вторичным – *Tragopogon* spp. (Asteraceae). *B. prunicola* является открытоживущим видом, принадлежащим к дендрохортобионтной фитобионтной группе. Тли формируют плотные колонии на нижней стороне листовых пластинок и (или) вершинах растущих побегов, что позволяет отнести их к числу листопобеговых меристемофильных форм. Заселенные побеги замедляют рост, а листовые пластинки – деформируются и обесцвечиваются [9].

Сливово-чертополоховая тля (*B. cardui*) в условиях Беларуси характеризуется голоциклическим двудомным биологическим циклом с зимовкой на стадии яйца. Основными первичными растениями-хозяевами являются: терн, или слива колючая (*Prunus spinosa* L.), алыча (*Prunus divaricate* Ledeb. (syn *Prunus cerasifera* Ehrh.)), слива домашняя (*Prunus domestica* L.). В качестве вторичных кормовых растений-хозяев выступают представители семейств Asteracea (*Leucanthemum maximum* (Ramond) DC., *L. vulgare* Lam.) и Boraginaceae. В условиях закрытого грунта могут продолжительное время существовать анголоциклические клоны [7]. *B. cardui* является открытоживущим видом, принадлежащим к дендротамнохортобионтной фитобионтной группе. Тли формируют плотные колонии на нижней стороне листовых пластинок и (или) вершинах растущих побегов, что позволяет отнести их к числу листопобеговых меристемофильных форм. Колонии локализируются на вершинах растущих побегов сливовых, что имеет следствием сильную деформацию листовых пластинок. Является переносчиком опасного вирусного заболевания – сливовой оспы (шарка) [10].

Согласно литературным данным, существуют различные мнения о значимости морфологических признаков на внутривидовом уровне, в связи с чем возникает необходимость поиска новых методов и подходов для корректной видовой диагностики представителей этого рода тлей, что позволит осуществлять мониторинг их численности и распространение по территории Беларуси, а также рационализировать применяемые защитные мероприятия.

Цель настоящей работы – разработать ПЦР-ПДРФ ключи, позволяющие осуществлять корректную видовую диагностику тлей рода *Brachycaudus*, образующих смешанные колонии на *Prunus* sp. в садовых и декоративных насаждениях, с исключением этапа секвенирования ДНК.

**Материалы и методы.** В работе использовали нуклеотидные последовательности фрагмента гена COI, представленные в Международных генетических базах данных NCBI и BOLD, а также нуклеотидные последовательности фрагмента гена COI для рода *Brachycaudus*, полученные авторами ранее.

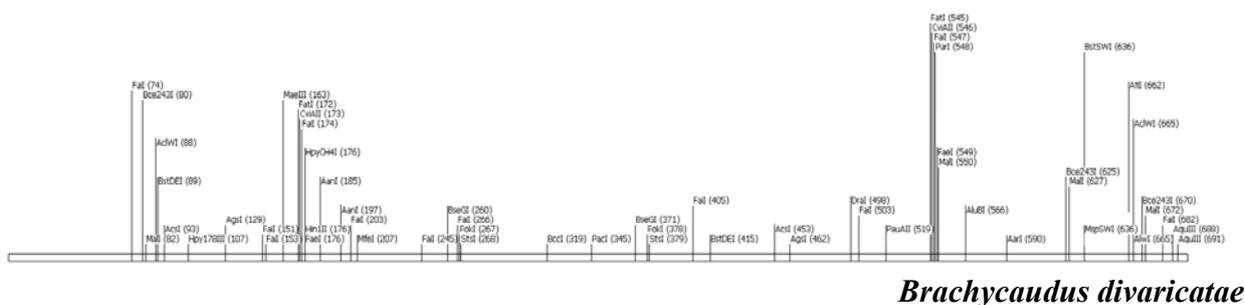
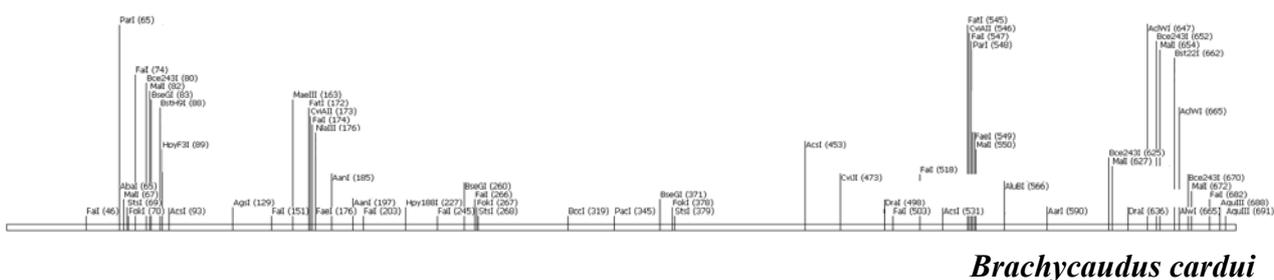
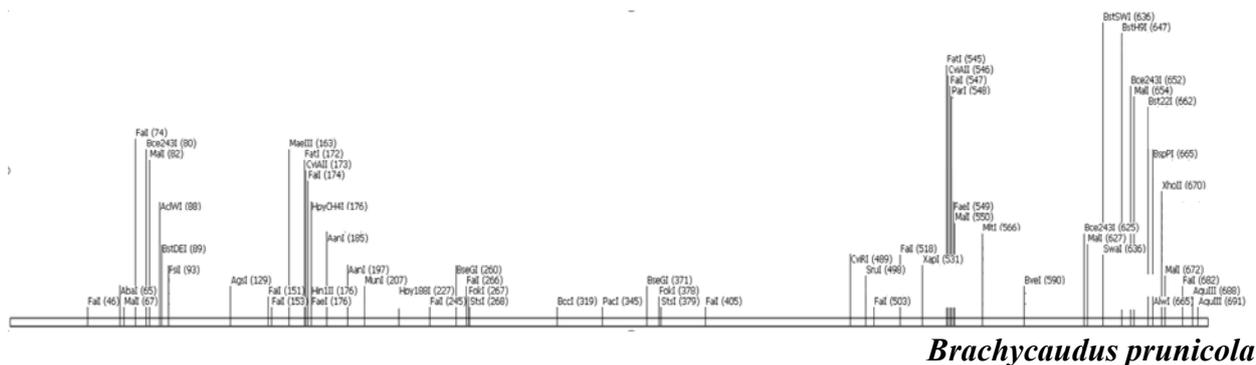
Всего проанализировано 253 нуклеотидных последовательностей фрагмента гена COI, среди которых 17 принадлежали *B. prunicola* (Франция, Италия, Беларусь), 154 – *B. divaricatae* (Беларусь, Франция, Литва) и 82 – *B. cardui* (Франция, Канада, Болгария, Пакистан, Германия, Турция, США, Италия и Грузия). Множественное выравнивание нуклеотидных последовательностей генов COI для каждого отдельного вида тлей провели в программе MEGA11. В программе DNAsp рассчитали число и дивергенцию гаплотипов. Поиск сайтов рестрикции в нуклеотидных последовательностях фрагмента гена COI осуществляли в программе MEGA11. Графические рестрикционные карты строили в программе CodonCodeAligner 4.2.7. Проанализировав построенные рестрикционные карты, создали ПЦР-ПДРФ ключи для идентификации тлей рода *Brachycaudus*.

**Результаты исследований и их обсуждение.** В рамках настоящего исследования расшифрованы нуклеотидные последовательности фрагмента гена COI для тлей *B. divaricatae* и *B. prunicola* рецессивной фауны Беларуси, которые были вовлечены для построения ПЦР-ПДРФ ключей.

Проанализировав все доступные нуклеотидные последовательности фрагмента гена COI, рассчитали число гаплотипов для каждого вида тлей рода *Brachycaudus* в отдельности. В доступных последовательностях (17 последовательностей) у *B. prunicola* было выявлено 2 гаплотипа COI со средним значением дивергенции гаплотипов 0,479, у *B. divaricatae* (154 последовательности) – 2 гаплотипа со средним значением дивергенции гаплотипов 0,432 и у *B. cardui* (82 последовательности) – 6 гаплотипов со средним значением дивергенции гаплотипов 0,683.

С учетом всех выявленных гаплотипов для каждого вида тлей в отдельности построили рестрикционные карты (рисунок).

По результатам сравнительного анализа рестрикционных карт анализируемых видов тлей рода *Brachycaudus*, были отобраны ферменты рестрикции для *B. prunicola* (4 фермента), *B. divaricatae* (1 фермент) и *B. cardui* (1 фермент), которые имели сайт узнавания в нуклеотидных последовательности фрагмента гена COI только одного из анализируемых видов тлей (таблица 1).



Рисунк – Рестрикцiонныя карты, пабудаваныя на аснове нуклеотыдных паслядоўнасцей фрагмента гена COI, для тлей роду *Brachycaudus*

Кроме того, выявлены ферменты, которые разрезали только нуклеотидные последовательности фрагмента гена COI тлей *B. divaricatae* (2 фермента), однако не разрезали нуклеотидные последовательности фрагмента гена COI тлей *B. cardui* и *B. prunicola* (таблица 2).

На основе полученных результатов нами созданы ПЦР-ПДРФ ключи, позволяющие проводить корректную диагностику рассматриваемых видов тлей рода *Brachycaudus*.

**Заключение.** Таким образом, расшифрованы нуклеотидные последовательности фрагмента гена COI для тлей *B. divaricatae* и *B. prunicola* рецентной фауны Беларуси, которые использованы для разработки ПЦР-ПДРФ ключей.

Построены рестрикционные карты для тлей для *B. prunicola*, *B. divaricatae* и *B. cardui* с учетом всех выявленных гаплотипов.

Отобраны ферменты рестрикции для *B. prunicola* (4 фермента), *B. divaricatae* (1 фермент) и *B. cardui* (1 фермент), которые имели сайт узнавания в нуклеотидных последовательности фрагмента гена COI только одного из анализируемых видов тлей, а также ферменты, которые разрезали только нуклеотидные последовательности фрагмента гена COI тлей *B. divaricatae* (2 фермента), однако не разрезали нуклеотидные последовательности фрагмента гена COI тлей *B. cardui* и *B. prunicola*.

Таблица 1. – ПЦР-ПДРФ ключи, позволяющие проводить корректную диагностику видов тлей рода *Brachycaudus*, созданные на основе анализа нуклеотидных последовательностей фрагмента гена COI

Сайт узнавания фермента	Вид	Длины образующихся фрагментов
CviRI		
TG^CA	<i>B. cardui</i>	489+204
	<i>B. divaricatae</i>	–
	<i>B. prunicola</i>	–
BstH9I		
GGATCNNNN^N	<i>B. cardui</i>	–
	<i>B. divaricatae</i>	647+46
	<i>B. prunicola</i>	–
XapI		
R^AATTY	<i>B. cardui</i>	–
	<i>B. divaricatae</i>	–
	<i>B. prunicola</i>	531+162
MltI		
R^AATTY	<i>B. cardui</i>	–
	<i>B. divaricatae</i>	–
	<i>B. prunicola</i>	566+127
Bse24I		
CCW^GG	<i>B. cardui</i>	–
	<i>B. divaricatae</i>	–
	<i>B. prunicola</i>	625+68
Bce243I		
^GATC	<i>B. cardui</i>	–
	<i>B. divaricatae</i>	–
	<i>B. prunicola</i>	652+41

Примечание – «-» – сайт узнавания данной эндонуклеазы в последовательности отсутствует; ^ – точка разрезания молекулы ДНК

Таблица 2. – ПЦР-ПДРФ ключи, позволяющие проводить корректную диагностику видов тлей рода *Brachycaudus*, созданные на основе анализа нуклеотидных последовательностей фрагмента гена COI

Сайт узнавания фермента	Вид	Длины образующихся фрагментов
DraI		
TTT^AAA	<i>B. cardui</i>	498+195
	<i>B. divaricatae</i>	–
	<i>B. prunicola</i>	498+195
FaiI		
YA^TR	<i>B. cardui</i>	503+190
	<i>B. divaricatae</i>	–
	<i>B. prunicola</i>	503+190

Примечание – «-» – сайт узнавания данной эндонуклеазы в последовательности отсутствует; ^ – точка разрезания молекулы ДНК

#### Список литературы

1. Aphids on the World's Plants: An online identification and information guide : [сайт]. – Lon-

don, 2012. – URL: <http://www.aphidsonworldsplants.info> (дата обращения: 09.06.2025).

2. Molecular phylogeny and systematic in the genus *Brachycaudus* (Homoptera: Aphididae): insights from a combined analysis of nuclear and mitochondrial genes / A. C. D'acier, G. Cocuzza, E. Jousselin [et al.] // *Zoologica Scripta*. – 2007. – Vol. 37, № 2. – P. 175–193.
3. Heie, O. E. Aphidoidea (Hemiptera) of Fennoscandia and Denmark. IV. Family Aphididae : Part 1 of tribe Macrosiphini of subfamily Aphidinae / O.E. Heie. – Copenhagen ; Leiden : E.J. Brill, 1991. – 190 p.
4. Buga, S. V. Aphids of the tribe Macrosiphini (Insecta: Homoptera: Aphididae) in Belarus / S. V. Buga, A. V. Stekolshchikov // *Zoosystematica Rossica*. – 2012. – Vol. 21(1). – P. 63–96.
5. Жоров, Д. Г. Инвазивные виды гемиптероидных насекомых (Insecta: Hemipteroidea) Беларуси (таксономический состав, экологические группы, географическое распространение, биологические основы вредности) : автореф. дис ... канд. биол. наук: 03.02.05 / Д. Г. Жоров; Белорусский государственный университет. – Минск, 2017. – 25 с.
6. Черная книга инвазивных видов животных Беларуси / В. П. Семенченко [и др.]; под общ. ред. В. П. Семенченко, С.В. Буги. – Минск : Беларуская навука, 2020. – 163 с.
7. Буга, С. В. Дендрофильные тли Беларуси / С. В. Буга. – Минск : БГУ, 2001. – 98 с.
8. Жоров, Д. Г. Адаптации биологических циклов чужеродных для фауны Беларуси видов тлей (Insecta: Sternorrhyncha: Aphidoidea) / Д. Г. Жоров, С. В. Буга // *Современные проблемы адаптации : IV Жученковские чтения международная научно-практическая конференция, Белгород, 24–26 сентября 2018 г.* – Белгород : ИД «Белгород» НИУ «БелГУ», 2018. – С. 95–97.
9. Харчанка, Н. Н. Некаторыя біялагічныя асаблівасці слівавай апыленай тлі ў Беларусі / Н. Н. Харчанка // *Весці АН БССР. Серыя сельскагаспадарчых навук.* – 1968. – № 3. – С. 71–73.
10. Alford, D.V. Pests of Fruit Crops: A Colour Handbook / D.V. Alford. – Manson Publishing, 2007. – 480 p.

## References

1. Aphids on the World's Plants: An online identification and information guide. London, Natural History Museum, 2012. Available at: <http://www.aphidsonworldsplants.info>. (accessed: 09.06.2025).
2. D'acier A.C., Cocuzza G., Jousselin E. et al. Molecular phylogeny and systematic in the genus *Brachycaudus* (Homoptera: Aphididae): insights from a combined analysis of nuclear and mitochondrial genes. *Zoologica Scripta*. 2007, vol. 37, no. 2, pp. 175–193.
3. Heie O. E. Aphidoidea (Hemiptera) of Fennoscandia and Denmark. IV. Family Aphididae : Part 1 of tribe Macrosiphini of subfamily Aphidinae. Copenhagen ; Leiden : E. J. Brill, 1991, 190 p.
4. Buga S., Stekolshchikov A. V. Aphids of the tribe Macrosiphini (Insecta: Homoptera: Aphididae) in Belarus. *Zoosystematica Rossica*. 2012, vol. 21(1), pp. 63–96.
5. Zhorov D. G. *Invazivny`e vidy` gemipteroidny`kh nasekomy`kh (Insecta: Hemipteroidea) Belarusi (taksonomicheskij sostav, e`kologicheskie grupy`, geograficheskoe rasprostranenie, biologicheskie osnovy` vredenosti)* [Invasive species of hemipteroid insects (Insecta: Hemipteroidea) of Belarus (taxonomic composition, ecological groups, geographical distribution, biological basis of harmfulness)]. Abstract of Ph. D. thesis.. Belarusian State University. Minsk, 2017, 25 p. (In Russian)
6. Semenchenko V. P. [et al.]. *Chernaya kniga invazivny`kh vidov zhivotny`kh Belarusi* [Black Book of Invasive Animal Species of Belarus]. Minsk, Belarusian Science, 2020, 163 p. (In Russian)
7. Buga S.V. *Dendrofil`ny`e tli Belarusi* [Dendrophilous aphids of Belarus]. Minsk, BSU, 2001, 98 p. (In Russian)
8. Zhorov D.G., Buga S.V. *Adaptaczii biologicheskikh cziklov chuzherodny`kh dlya fauny` Belarusi vidov tlej (Insecta: Sternorrhyncha: Aphidoidea)* [Adaptations of biological cycles of aphid species alien to the fauna of Belarus (Insecta: Sternorrhyncha: Aphidoidea)]. *Sovremenny`e problemy` adaptaczii* [Modern problems of adaptation]. Belgorod, ID «Belgorod» National Research University «BelsU», 2018, pp. 95–97. (In Russian)

9. Kharchanka N. N. Nekatory`ya biyalagichny`ya acablivasczi slivavaj apy`lenaj tli u` Belarusi [Some biological aphids drain dusty aphids from Belarus]. *Vesczi AN BSSR. Sery`ya sel`skagaspadarchy`kh navuk* [News of the Academy of Sciences of the BSSR. Ser. S.-G. Navuk]. 1968, no. 3, pp. 71–73. (In Belarusian)
10. Alford D.V. Pests of Fruit Crops: A Colour Handboo. Manson Publishing, 2007, 480 p.

*Received 9.04.2025*