

РАЗРАБОТКА ПЦР-ПДРФ-КЛЮЧЕЙ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ ТЛЕЙ *APHIS POMI* DEG. И *APHIS SPIRAECOLA* PATCH В БЕЛАРУСИ

Беляк О.А.¹, Жоров Д.Г.²

¹студентка 5 курса БГУ, г. Минск, Республика Беларусь

Научный руководитель – Воронова Н.В., канд. биол. наук, доцент;

²аспирант кафедры зоологии БГУ, г. Минск, Республика Беларусь

Научный руководитель – Буга С.В., доктор биол. наук, профессор

В настоящее время одной из экологических проблем глобального уровня является проникновение в региональные фауны инвазивных видов животных. Наиболее опасными среди инвазивных видов насекомых являются вредители культивируемых и других хозяйственно ценных растений. Вызываемые фитофагами разного типа повреждения, тератотрансформация и, как результат, снижение урожайности или декоративных качеств растений могут приводить к серьезным экономическим потерям. По этой причине выявление и мониторинг распространения фитофагов-инвайдеров является предельно актуальной задачей.

В Беларуси основным вредителем садовых и декоративных растений семейства Розоцветные (Rosaceae) среди тлей рода *Aphis* L. до недавнего времени являлась зеленая яблонная тля (*Aphis pomi* Deg., 1773), повреждающая преимущественно яблоню домашнюю (*Malus domestica* Borkh., 1803) и заселяющая также груши (*Pyrus* spp.), рябины (*Sorbus* spp.), боярышники (*Crataegus* spp.), кизильники (*Cotoneaster* spp.) и некоторые другие плодово-ягодные, лекарственные и декоративные растения [1]. В 80-е годы XX века было отмечено активное расселение по Европейскому континенту зеленой цитрусовой тли (*Aphis spiraecola* Patch, 1914). На территории Республики Беларусь этот вид был впервые зарегистрирован в 2000 г. в Городокском районе Витебской области на спирее белой (*Spiraea alba* Du Roi) [4]. Кроме спирей *A. spiraecola* развивается на кизильниках, боярышниках и некоторых других представителях семейства Розоцветные [2] и является переносчиком более чем десятка возбудителей вирусных заболеваний растений [3].

В Европе *A. spiraecola* регистрируется преимущественно на молодых растениях, особенно тех, которые выращиваются для использования в качестве подвоев. Здесь она часто образует смешанные колонии с *A. pomi* [4], к которой очень близка по окраске и деталям морфологии. Поскольку спектр наиболее уязвимых повреждаемых растений, а также эффективность переноса фитопатогенных вирусов у этих видов различаются, возникает необходимость их дифференциации в целях не только мониторинга состава афидофауны, но и корректного планирования мероприятий по контролю популяций и ограничению вредоносности фитофагов.

Как было сказано выше, идентификация *A. pomi* и *A. spiraecola* по морфологическим ключам может вызывать затруднения. Использование методов идентификации, основанных на анализе ДНК, позволяет решить такого рода проблемы. В связи с этим, целью нашей работы было изучение возможности применения метода ПЦР-ПДРФ-анализа для идентификации тлей *A. pomi* и *A. spiraecola*.

Материал и методы. В общей сложности была проанализирована 491 нуклеотидная последовательность гена, кодирующего белок субъединицы 1 цитохромоксидазы *c* (COI), исследуемых видов тлей: 203 и 288 для *A. pomi* и *A. spiraecola* соответственно. Длина выбранного участка гена составляла 658 нуклеотидов и соответствовала фрагменту Фолмера. Последовательности были расшифрованы сотрудниками кафедры зоологии БГУ или получены из GenBank NCBI. Выравнивание последовательностей провели с использованием алгоритма Muscle в программе MEGA6; графические рестрикционные карты построили средствами CodonCodeAligner 4.2.7.

Результаты и их обсуждение. Сущность метода ПЦР-ПДРФ-анализа заключается в обработке выбранного участка маркерного гена ферментами рестрикции. Размер и количество получаемых фрагментов зависят от локализации сайтов рестрикции в конкретной последовательности маркерного гена. Учитывая, что разные виды тлей обладают отличными последовательностями COI, расположение сайтов рестрикции в них также будет различным. Идентификация видов в этом случае возможна после визуализации продуктов рестрикции в электрофоретическом геле.

При работе с нуклеотидными последовательностями *A. spiraecola* внутривидового полиморфизма COI обнаружено не было. В результате анализа рестрикционных карт были выявлены сайты узнавания для 15-ти ферментов рестрикции. Один сайт имели рестриктазы BseNI, FspBI, Alw26I, Csp6I, RsaI, NphI, EcoRII, BmeI390I и MvaI, причем у последних двух ферментов сайты узнавания в нуклеотидной последовательности совпадают, поскольку являются вырожденными. Два сайта узнавания имели ферменты AluI, HpyF3I, BseGI, BspPI, Hin1II и TaqI.

Генетического разнообразия среди исследуемых нуклеотидных последовательностей *A. pomi* также не было выявлено. Отмечены сайты узнавания для 14-ти ферментов рестрикции. Один сайт имели рестриктазы BmsI, BseNI, FspBI, HpyF3I, LweI, TaqI, HinfI, PfiI, NphI и SsiI, два сайта – ферменты AluI, MboII и BseGI.

При сопоставлении полученных данных выяснилось, что корректная видовая идентификация тлей *A. pomi* и *A. spiraecola* возможна с использованием следующих рестриктаз: BmsI, EcoRII, RsaI, Csp6I, FspBI, LweI, HinfI, PfiI и SsiI. Сайты узнавания ферментов рестрикции EcoRII и RsaI были обнаружены только в последовательностях *A. spiraecola*, в то время как рестриктазы BmsI, Csp6I, FspBI, LweI, HinfI, PfiI и SsiI имели сайты узнавания только в последовательностях *A. pomi*. Фермент рестрикции FspBI имеет один сайт узнавания в нуклеотидных последовательностях обоих исследуемых видов тлей, однако образуемые рестрикционные фрагменты различаются по длине (558 и 100 нуклеотидов у *A. spiraecola*, 408 и 250 нуклеотидов у *A. pomi*). Таким образом, использование любой из вышеупомянутых рестриктаз позволяет идентифицировать исследуемые виды тлей.

Эндонуклеазы HpyF3I, MboII, BspPI, Hin1II, TaqI, Alw26I, BmeI390I и MvaI также позволяют различить исследуемые виды тлей, однако использование данных ферментов, по нашему мнению, не целесообразно, так как их сайты рестрикции находятся на расстоянии менее 100 нуклеотидов от конца ПЦР-продукта, что может затруднить визуализацию и интерпретацию результатов.

Заключение. Показано, что метод ПЦР-ПДРФ-ключей может быть успешно использован для дифференциации видов *A. pomi* и *A. spiraecola*. Альтернативная идентификация этих видов может быть проведена с использованием любой из следующих рестриктаз: BmsI, EcoRII, RsaI, Csp6I, FspBI, LweI, HinfI, PfiI и SsiI.

Литература

1. Holman, J. Host Plant Catalog of Aphids. Palaearctic Region / J. Holman. –Berlin, 2009. – 1140 p.
2. Vukasinovic, D. Morphological and molecular identification of apple pests *Aphis spiraecola* and *Aphis pomi* in Serbia / D. Vukasinovic, O. Petrovic-Obradovic, J. Jovic, A. Vucetic // 8th International Symposium on Aphis. – 2009. – P. 155.

3. Aphids on the World's Plants: An online identification and information guide [Electronic resource]. – 2012. – Mode of access: <http://www.aphidsonworldsplants.info>. – Date of access: 17.07.2016.
4. Rakauskas, R. Contribution to the knowledge of the aphid (Hemiptera, Sternorrhyncha: Aphidoidea) fauna of the Gorodok Highland, Belarus / R. Rakauskas, S. Buga // *Acta Zoologica Lithuanica*. – 2010. – Vol. 20, n. 4. – P. 205–224.
5. Fauna Europaea [Electronic resource]. – 2000–2014. – Mode of access: <http://www.faunaeur.org/> – Date of access: 17.07.2016.