

**ПОДБОР МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ ДЛЯ ВИДОВОЙ
ДИАГНОСТИКИ ТЛЕЙ И ПОСТРОЕНИЯ ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИХ СИСТЕМ****Н.В. Воронова, В.П. Курченко, С.В. Буга***Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь***Введение**

Эволюционно мобильные группы беспозвоночных, находящиеся в состоянии интенсивной, а в ряде случаев – экстенсивной дивергенции [1], зачастую требуют применения особых подходов при проведении геносистематических и филогенетических исследований. Семейство *Aphididae* характеризуется исключительной эволюционной динамикой [2]. Появление новых видов как на месте старых, в рамках той же экологической ниши (экстенсивная дивергенция), так и с проникновением образующегося вида в новые адаптивные зоны (интенсивная дивергенция) осуществляется непрерывно. В настоящее время среди тлей отмечают большое количество «проблемных» форм и групп: видов с неясным таксономическим положением; родов, четкие границы между которыми не удается установить; и таксонов более высокого ранга – таких как трибы, состав которых не ясен и требует ревизий.

Методы молекулярно-генетической идентификации видовой принадлежности в фаунистических и, конкретно, афидологических исследованиях применяются все более широко, поскольку морфологические приемы идентификации зачастую не позволяют разделить близкородственные, трудно дифференцируемые виды, а тем более виды-двойники [3, 4]. Многие методы генетического анализа и геносистематики, разработанные для других таксонов позвоночных и беспозвоночных животных, успешно применяются в афидологических исследованиях и позволяют не только производить диагностику криптических видов, но и проводить масштабные эволюционные и филогенетические построения [5, 6].

Для дифференциации видов, а также для анализа внутривидового полиморфизма используют молекулярно-генетические маркеры, представляющие собой частичные последовательности более или менее консервативных областей генома. Это кодирующие и некодирующие участки генов или межгенные спейсеры, для которых в результате исследований, проведенных на разных группах организмов, показано, что скорость эволюции геномов по этим областям положительно коррелирует со скоростью эволюции таксонов, которую можно оценить с использованием иных критериев: морфологического, экологического, биохимического и др. [7]. Следует отдельно отметить, что для корректного осуществления видовой диагностики и построения верификатных филогенетических систем важнейшим методологическим компонентом является выбор информативных генетических маркеров, предоставляющих ясный (неискаженный) филогенетический сигнал и, что не менее важно, доступных для рутинного применения.

Митохондриальная ДНК (мтДНК) – часть генома эукариот, наиболее широко использующаяся в геносистематических исследованиях насекомых [8, 9]. Удобство использования последовательностей мтДНК для филогенетического анализа обеспечивается ее гаплоидностью и строго однолинейной передачей наследственной информации в ряду поколений. Благодаря этому происхождение митохондриальных гаплотипов носит дихотомический характер, и момент возникновения дихотомии может быть установлен во временном ряду с большей долей вероятности, чем это возможно для хромосомных маркеров [10, 11]. В качестве универсального маркера для ДНК-паспортизации видов животных был выбран участок, соответствующий области с 1490 по 2911 нуклеотид митохондриального генома *Drosophila yakuba* Burla, а именно частичная последовательность гена субъединицы I цитохромоксидазы c (COI).

По многим данным, ядерные гены обеспечивают более устойчивый филогенетический сигнал, чем *COI*, на протяженных участках временной шкалы из-за меньшего его экранирования возможными гомоплазиями [12, 13]. Возможность использования при анализе последовательностей ядерной ДНК (ядНК) не только кодирующих участков, но и инtronов, позволяет выбрать более или менее вариабельные маркеры, в зависимости от целей проводимого исследования. Субъединица α фактора элонгации 1 (*EF-1α*) – один из наиболее перспективных ядерных маркеров, использующийся в геносистематике и филогении насекомых [14–16].

Гены, кодирующие рибосомальные РНК (рДНК), также относятся к областям ядерного генома, широко использующимся в эволюционном анализе насекомых. Это в первую очередь связано с существованием механизмов, обеспечивающих концептную эволюцию указанных генов и их гомологов. Самы гены рРНК, являясь эволюционно консервативными, предоставляют удобные сайты для связывания праймеров, в то время как находящиеся между ними некодирующие межгенные спейсеры представляют собой высоко вариативные области, удобные для применения в филогенетических исследованиях (в том числе близких таксонов), идентификации криптических видов, а также популяционных и филогеографических исследований [17, 18]. Межгенные транскрибуемые спейсеры (ITS) представляют собой последовательности, располагающиеся между генами 18S и 5,8S (ITS1), а так же 5,8S и 28S рРНК (ITS2).

Несмотря на обилие работ, посвященных геносистематическим исследованиям насекомых, стоит учитывать, что различные маркеры обладают способностью поставлять филогенетический сигнал на том или ином таксономическом уровне – от индивидуального, до уровня классов и типов, что определяет их пригодность для каждого конкретного исследования [12]. Целью данной работы было определить пригодность использования *COI*, *EF-1α* и ITS для филогенетических исследований тлей.

Методы исследования

Сборы тлей исследуемых видов провели в 2008–2010 гг. Данные об исследованных энтомологических образцах представлены в таблице 1. Из одних и тех же сборов отбирали образцы для морфологического определения и выделения ДНК. Для морфологического определения насекомых изготовили тотальные препараты для микроскопии, хранящиеся в коллекции кафедры зоологии Белорусского государственного университета.

Для выделения ДНК использовали DNA Purification Kit (Fermentas, Литва). ПЦР проводили в стандартных условиях с праймерами: LCO1490/HCO2198 (*COI*) [8], IF-1αF/*EF-1αR* (*EF-1α*) [19]; B/C (ITS1) [20]; ITS5/ITS4, its3Trem/its2Trem (ITS1-5,8S-ITS2) [21, 22]; CAS5p8sFc/CAS28sB1d, 5,8S-F/28S-R (ITS2) [23, 24] и Pfu-полимеразой (Fermentas, Литва).

ДНК-продукт секвенировали на 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA) с BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, USA). Множественное выравнивание, статистический анализ последовательностей и построение филограмм провели в программе MEGA4. Генетические дистанции (GD) между последовательностями вычисляли по методу максимального правдоподобия, который учитывает вероятность нахождения каждого нуклеотида в каждой конкретной позиции [25]. В качестве последовательности сравнения использовали ортологичные последовательности *Acyrtosiphon pisum* Harr. (NC011594, AK341330). При расчете GD и построении дендрограмм были так же использованы последовательности иных видов тлей, полученные из GenBank (NCBI). Идентификационные коды данных последовательностей указаны на соответствующих рисунках.

Применимость маркера для работы на различных уровнях оценивали исходя из фундаментального принципа геносистематики, согласно которому уровень внутривидовой вариативности любого локуса должен быть ниже, чем уровень вариативности этого локуса у особей разных видов [26].

Таблица 1 – Афидологический материал, использованный в исследовании

Вид	Шифр образца	Дата сбора	Растение-хозяин	Место сбора	Код доступа в GenBank
<i>Aphis fabae cirsiiacanthoidis</i> (Scop.)	08-34	15.07.2008	<i>Cirsium arvense</i> (L.) Scop.	Беларусь, Минский р-н, окр. д. Щемыслица	JF340105
<i>Aphis fabae fabae</i> Scop.	10-43	15.08.2010	<i>Chenopodium album</i> L.	Беларусь, Минский р-н, п. Крыжовка	JF340098
<i>Aphis fabae ex Philadelphus sp.</i>	08-21	13.06.2008	<i>Philadelphus sp.</i>	Беларусь, г. Минск, городские насаждения	–
<i>Aphis idaei</i> v.d. Goot	10-454	09.07.2010	<i>Rubus idaeus</i> L.	Беларусь, Столбцовский р-н., окр. д. Слобода	–
<i>Aphis ruborum</i> Börn.	10-504	14.07.2010	<i>Rubus caesius</i> L.	Беларусь, Минская обл., Столбцовский р-н, окр. д. Клетище	JF340108
<i>Aphis vaccinii</i> (Börn.)	10-509	14.07.2010	<i>Vaccinium uliginosum</i> L.	Беларусь, Минская обл., Столбцовский р-н, окр. д. Клетище	JF340094
<i>Aphis pomi</i> Deg.	09-10	30.06.2010	<i>Malus domestica</i> Borch.	Беларусь, Минский р-н, д. Прилуки	–
<i>Brachycaudus lychnidis</i> (L.)	10-489	10.07.2010	<i>Silene borysthenum</i> (Gruner) Walters	Беларусь, Минская обл., Копыльский р-н, окр. д. Песочное	JF776570
<i>Brachycaudus divaricatae</i> Shap.	10-467	10.07.2010	<i>Prunus divaricata</i> (Ldb.)	Беларусь, Минская обл., г. Несвиж	–
<i>Dysaphis sorbi</i> (Kalt.)	10-42	09.08.2010	<i>Sorbus aucuparia</i> L.	Беларусь, Минский р-н, п. Крыжовка	JF340097
<i>Dysaphis lappae lappae</i> (Koch)	10138	27.07.2010	<i>Arctium lappa</i> L.	Россия, Майамский р-н, п. Рыбалка	JF340109
<i>Dysaphis newskyi</i> (Börn.)	10084	04.07.2010	<i>Heracleum</i> sp.	Россия, Турочакский р-н, п. Артыбаш	JF340113
<i>Myzus cerasi cerasi</i> (Fab.)	10-503	14.08.2010	<i>Cerasus vulgaris</i> Mill.	Минская обл., г. Столбцы	JF340107
<i>Myzus cerasi pruniavium</i> (Börn.)	10-466	10.07.2010	<i>Cerasus avium</i> L.	Беларусь, Минская обл., г. Несвиж	JF340100
<i>Phorodon humuli</i> Schrk.	01-10	30.06.2010	<i>Prunus armeniaca</i> L.	Беларусь, Минский р-н, д. Прилуки	–

Результаты и обсуждение

Использование *COI* в видовой диагностике и дифференциации подвидов тлей

Для уточнения ранга таксонов тлей, на котором *COI* мог быть использован в качестве филогенетического маркера, было проведено сравнение частичных последовательностей *COI* в четырех группах. В рамках нашего исследования мы изучили применимость *COI* как филогенетического маркера по двум направлениям:

1) в трех группах межвидового уровня (роды *Aphis* L., *Myzus* Pass. и *Brachycaudus* v.d. Goot);

2) в двух группах внутривидового уровня (*A. fabae fabae*, *A. fabae cirsiiacanthoidis*, *A. fabae solanella*, *A. fabae* ssp. ex *Philadelphus* sp.; а также *M. cerasi cerasi* и *M. cerasi pruniavium*).

При расчете генетических дистанций между видами и подвидами рода *Aphis*, включенными в исследование, обнаружили, что GD для видов, подвергнутых сравнению, варьировала от 0,017 до 0,099, среднее межвидовое значение составило 0,072. При сравнении генетической дистанции между подвидами *A. fabae*, в частности между *A. fabae solanella*, *A. fabae cirsiiacanthoidis*, *A. fabae fabae* и не установленными формами *A. fabae* ex *Philadelphus* sp. и *A. fabae* ssp., выяснили, что не существует дистанции между *A. fabae solanella* и *A. fabae cirsiiacanthoidis*. В то же время, GD между указанными подвидами и *A. fabae fabae* составляет 0,011, что соизмеримо с дистанцией между формами видового ранга –

A. vaccinii и *A. fabae* ssp., составляющей 0,017, и существенно больше, чем дистанция между видами *A. ruborum* и *A. idaei*, равная 0,003. Не исключено, что столь малое значение генетической дистанции для видов *A. ruborum* и *A. idaei* свидетельствует об ошибочном присвоении этим формам видового ранга, однако указанное явление может так же быть следствием случайных вторичных гомоплазий.

На дендрограмме филогенетических взаимоотношений видно, что значение будстреп-теста для кластера *A. fabae* ssp., исключающего подвид *A. fabae fabae*, составляет 11%, что не достаточно для того, чтобы признать существование кластера достоверным (рисунок 1).

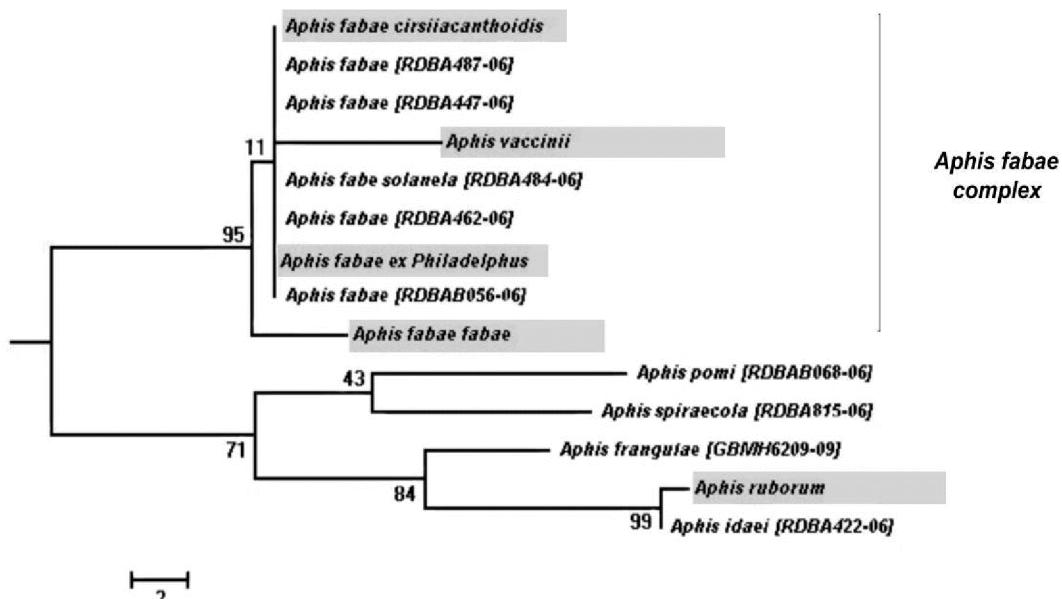


Рисунок 1 – Дендрограмма филогенетических взаимоотношений видов и подвидов рода *Aphis* L., построенная с использованием метода минимума эволюции на основе анализа последовательности *COI*

Таким образом, на основании данных анализа последовательности *COI*, невозможно признать существование «хороших» подвидов внутри комплекса *A. fabae*.

Аналогичное сравнение провели для другого рода тлей – *Myzus*, рассчитав генетические дистанции между формами подвидового (*M. cerasi cerasi*, *M. cerasi pruniavium* и *M. cerasi* ssp.), а так же видового уровня.

Внутри рода величины генетических дистанций варьировали от 0,058 до 0,090 со средним – 0,072, что совпадает со значениями, полученными для проанализированных видов рода *Aphis*. Между подвидами *M. cerasi cerasi* и *M. cerasi pruniavium* генетическая дистанция по нуклеотидной последовательности *COI* равна 0,014. Это лишь незначительно превышает значения, полученные для форм группы *Aphis fabae* ssp., которые не разделялись на дендрограмме на кластеры, соответствующие отдельным подвидам. Дистанция между другими исследованными видами рода *Myzus* оказалась существенно большей, чем между указанными подвидами. На дендрограмме, построенной с использованием метода МЕ, наблюдается четкое разделение представителей группы *M. cerasi* ssp. на три кластера (рисунок 2).

В один из указанных кластеров, как и ожидалось, вошел подвид *M. cerasi cerasi*, в другой – *M. cerasi pruniavium*. Кроме того, обнаружен третий кластер, сформированный образцами *M. cerasi* ssp. с не установленной подвидовой принадлежностью.

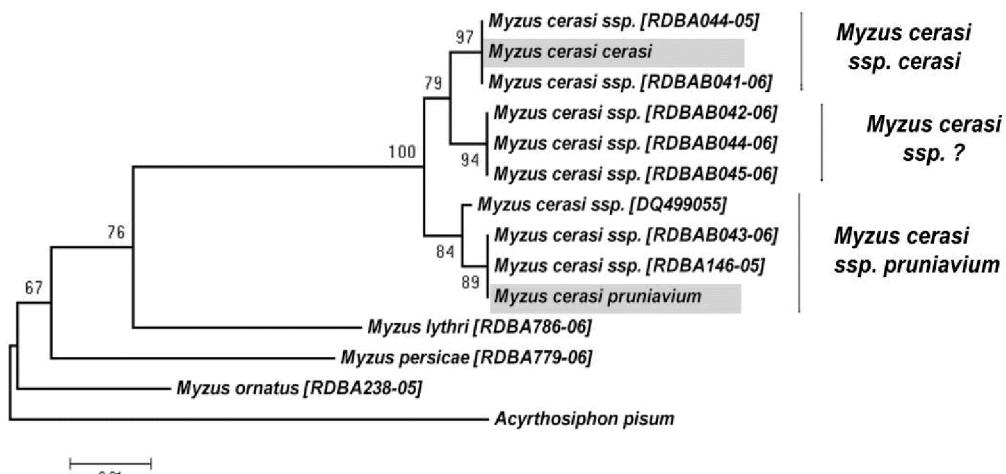


Рисунок 2 – Дендрограмма филогенетических взаимоотношений видов и подвидов рода *Myzus* Pass., построенная с использованием метода минимума эволюции на основе анализа последовательности *COI*

Мнение о существовании еще, по меньшей мере, двух подвидов *M. cerasi* (а именно, *M. cerasi veronicae* Walk. и *M. cerasi umeoliae* Shinji), не дифференцируемых морфологически, высказывали и другие авторы [27–29]. Указанные формы имеют различия в биологических циклах и отличаются приуроченностью к разным кормовым растениям. Данный факт свидетельствует о том, что осуществляется радиация форм, прежде развивавшихся однодомно на первичном древесном растении. Однако до сих пор не существует единого мнения о безусловности биологических признаков в таксономии близких форм [30]. Наши данные показали, что существуют генетические различия между формами *M. cerasi*, а именно – в мировой фауне *M. cerasi* присутствуют обладатели как минимум трех гаплотипов *COI*, соответствующих подвидам *M. cerasi cerasi*, *M. cerasi pruniavium* и третьему, не идентифицированному подвиду.

Представители рода *Brachycaudus* сформировали внутриродовую группу сравнения, в связи с чем, для них так же были рассчитаны значения GD. Генетическое расстояние между исследованными видами рода *Brachycaudus* варьировало от 0,011 до 0,070 при среднем значении – 0,048. Следует отметить, что внутри группы, представляющей вид *B. helichrysi* Kalt., обнаружены формы, генетическая дистанция между которыми больше, нежели между подвидами *A. fabae* или *M. cerasi*, и достигает 0,025. Указанная величина GD по данному маркеру не только соизмерима с генетической дистанцией, регистрируемой между дискретными видами рода *Aphis*, но и превышает дистанцию между всеми представителями *B. helichrysi* и другим видом этого рода – *B. spiraea* Börn. На дендрограмме филогенетических взаимоотношений между исследуемыми видами рода *Brachycaudus* все образцы последовательностей *COI* *B. helichrysi* разделяются на два кластера со значением индекса бутстрепа равном 100%. Что позволяет предположить существование внутри *B. helichrysi* подвидов (или даже криптических видов), не описанных в настоящее время (рисунок 3).

Ранее исследователями высказывались предположения о существовании подвидов *B. helichrysi* [31]. Данное мнение основывалось на особенностях экологии форм, развивавшихся на клевере луговом (*Trifolium pretense* L.). Наше исследование выявило два гаплотипа *COI*, которые могут соответствовать подвидам.

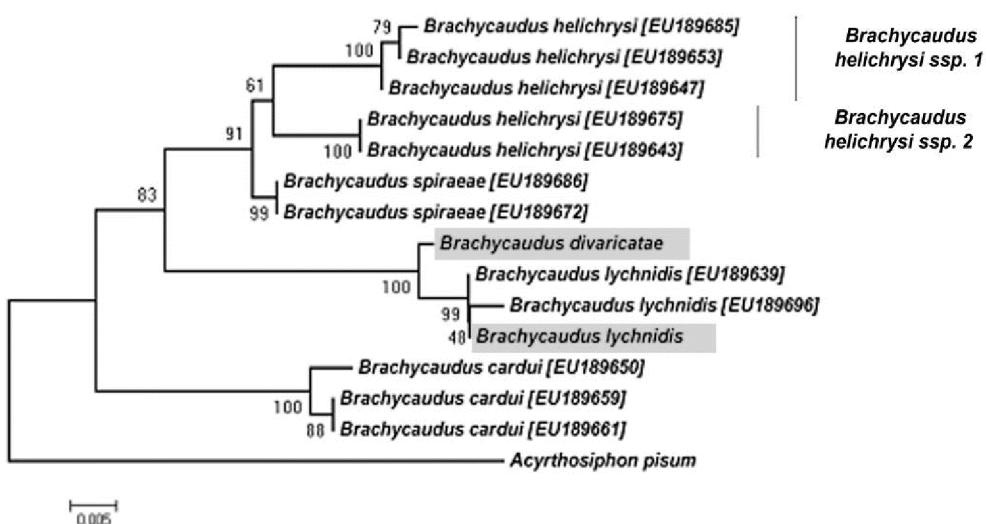


Рисунок 3 – Дендрограмма филогенетических взаимоотношений видов и подвидов рода *Brachycaudus* v.d. Goot, построенная с использованием метода минимума эволюции на основе анализа последовательности *COI*

Таким образом, показано, что сравнение частичных последовательностей гена *COI* может предоставить устойчивый филогенетический сигнал при работе с формами тлей видового и подвидового уровней. Использование *COI* позволяет выявить морфологически недифференцируемые подвиды в «смешанных» видовых группах. Установлено существование генетически «хороших» подвидов *Myzus cerasi* и *Brachycaudus helichrysi*. В то же время, анализ последовательности *COI* в комплексе *Aphis fabae* показал, что между формами комплекса отсутствуют различия, достаточные для выделения подвидов.

Использование *EF-1 α* в видовой диагностике тлей

Филогенетическую информативность *EF-1 α* оценили по результатам сравнения последовательности фрагмента гена *EF-1 α* длиной 493 п.н. для 11 видов тлей, принадлежащих к 4 родам из 2 триб. В частности, произвели расшифровку *EF-1 α* для *A. idaei*, *A. ruborum*, *A. fabae fabae*, *Aphis sp.*, *Ph. humuli*, *D. sorbi*, *D. newskyi*, *D. lappae lappae*. Еще три последовательности *EF-1 α* тлей рода *Brachycaudus* получили из GenBank. Исследованный фрагмент гена включал экзон, гомологичный участку с 491 по 889 нуклеотид соответствующей мРНК (AK341330), а также 5'-прилежащий высоковариабельный участок длиной 94 нуклеотида, представляющий собой концевой фрагмент интрана гена *EF-1 α* .

По результатам анализа генетических дистанций между последовательностями *EF-1 α* указанной группы тлей обнаружили, что внутриродовые дистанции, рассчитанные по данному маркеру, соизмеримы с GD, полученными на основе сравнения последовательностей *COI*. В частности, средняя генетическая дистанция между видами рода *Dysaphis* составила 0,054, между видами рода *Brachycaudus* – 0,034, а между отдельными видами рода *Aphis* средняя дистанция была равна 0,051. В то же время GD между представителями близких родов, оказались заметно выше, чем это было указано для последовательности *COI*. А именно, средняя дистанция между группами *Dysaphis* и *Brachycaudus* составила 0,256, что указывает на существенные межродовые различия по сравниваемой последовательности *EF-1 α* даже между сестринскими родами. Данный факт может быть обусловлен включением в анализ не только белок-кодирующей последовательности, но и, частично, 5'-прилежащего интрана. Интраны, которые не находятся под прямым действием отбора, способны накапливать и сохранять в ряду поколений большее число замен во всех трех позициях кодонов, нежели консервативные белок-кодирующие последовательности. При этом общая топология ветвей получаемых деревьев совпадает с расположением клад на дендрограммах, построенных на основе последовательности *COI*. Указанный факт свидетельствует о высокой валидности данных,

получаемых с использованием последовательностей генов *COI* и *EF-1 α* в качестве молекулярных маркеров видовой диагностики тлей.

Принято считать, что у всех организмов митохондриальные гены, к которым относится *COI*, менее консервативны, чем гены ядерной ДНК (в данном случае – *EF-1 α*) [12]. Однако в нашем случае, при включении в анализ участка, соответствующего инtronу, GD между отдельными видами и родами оказались существенно выше, чем это было показано для *COI*. Получаемые с использованием *EF-1 α* значения генетических дистанций указывают на принципиальную возможность использования данного маркера на уровне выше родового.

Использование ITS-регионов в видовой диагностике тлей

Несмотря на то, что ITS-регионы успешно применяются в видовой диагностике многих беспозвоночных животных, работы по филогенетике тлей, основанные на анализе данных областей генома, крайне малочисленны. Авторы, использовавшие эти маркеры, указывают, что в процессе получения целевого фрагмента столкнулись с рядом трудностей. В частности отмечалось, что при амплификации как ITS1, так и ITS2 происходит синхронный синтез нескольких фрагментов разной длины, в то время как известно, что аллелизм по генам рРНК у животных наблюдается крайне редко. Преодолеть указанные сложности было возможно только путем использования специфических ДНК-полимераз, пригодных для амплификации ГЦ-богатых фрагментов [4].

Мы провели оценку пригодности ITS-регионов тлей для рутинного использования в филогенетике тлей. При попытках получить фрагменты ITS были опробованы различные пары праймеров, а также их сочетания [20–24]. Предполагали получить ITS1, ITS2 и фрагмент, включающий обе ITS области и полноразмерный ген 5,8S рРНК, находящийся между ними. Однако, несмотря на варьирование условий ПЦР и состава реакционной смеси, а также использования агентов, снижающих температуру плавления ДНК (ДМСО в конечной концентрации 5%) не удалось получить воспроизводимые результаты в данном эксперименте. Во-первых, результаты ПЦР не были стабильны и, при использовании одной и той же ДНК-матрицы, могли приводить как к получению нескольких полиморфных фрагментов, так и к полному отсутствию продукта на электрофорограмме. Полиморфизм получаемых фрагментов не демонстрировал ни индивидуальной, ни видовой зависимости, а был вызван, скорее, трудно определяемыми условиями каждой конкретной ПЦР. Во-вторых, получаемые фрагменты для тлей разных видов из разных родов не дифференцировались по молекулярной массе, как это описано для животных других групп [22].

При попытке определить причину указанных осложнений (невозможности стабильного получения единичного фрагмента ITS) проанализировали ряд последовательностей опубликованных в GenBank и представляющих собой ITS1 и ITS2 различных видов тлей, в частности ITS1 *Amphorophora idaei* Börn., ITS2 *Brachycaudus ballotae* Pass., *Aphis passeriniana* Guerc. и *Macrosiphum* sp. и весь ITS-регион *Myzus persicae* Šulz.. В процессе анализа нуклеотидных последовательностей рассчитали содержание ГЦ-пар, а так же содержание абсолютно ГЦ-богатых кодонов (имеющих гуанин или цитозин во всех трех позициях) в целевых фрагментах. Анализ нуклеотидного состава указанных областей показал, что в полной последовательности ITS-региона *M. persicae* (1911 bp) содержание ГЦ-пар составляет 63%. ITS1 *A. idaei* (220 bp) содержит 68% гуанина и цитозина, а содержание этих оснований в ITS2 *B. ballotae* (415 bp), *A. passeriniana* (409 bp) и *Macrosiphum* sp. (381 bp) равно 68%, 72% и 66%, соответственно. Содержание абсолютно ГЦ-богатых кодов в этих участках превышало 30%.

Столь высокое содержание ГЦ-пар в ITS-областях, очевидно, является специфической особенностью генома тлей, не свойственной большинству других насекомых (таблица 2).

Только представители отряда Lepidoptera несколько приближаются к тлям по содержанию ГЦ в ITS областях. Однако содержание абсолютно ГЦ-богатых кодонов в ITS-фрагментах тлей значительно превышает таковое, наблюдавшееся для насекомых других таксономических групп.

Таблица 2 – Процентное содержание гуанина и цитозина в ITS-регионах насекомых разных таксонов

Таксон	Вид	Фр.	L, bp	ГЦ, %	Абс. ГЦ, %	Код GenBank
Homoptera	<i>Amphorophora idaei</i> (Börn.)	ITS1	220	68	38,4	X78807
Homoptera	<i>Aphis passeriniana</i> (Guerc.)	ITS2	409	72	37,5	EU189560
Homoptera	<i>Brachycaudus ballotae</i> (Pass.)	ITS2	415	68	31,2	EU189570
Homoptera	<i>Macrosiphum sp.</i>	ITS2	381	66	30,7	EU189539
Homoptera	<i>Myzus persicae</i> (Šulz.)	ITS	1911	63	30,0	AF487712
Hymenoptera	<i>Apis mellifera mellifera</i> L.	ITS1	127	22	2,4	DQ195226
Lepidoptera	<i>Plebejus zephyrinus</i> (Christoph.)	ITS2	432	56	19,4	HM175710
Coleoptera	<i>Oreina elongata ruffoi</i> (Franz.)	ITS2	589	46	8,2	GQ220169
Diptera	<i>Anopheles hyrcanus</i> (Pall.)	ITS2	547	47	9,3	AY515175

Примечание. Фр. – фрагмент, L, bp – длина фрагмента (п.н.), Абс. ГЦ – «абсолютно ГЦ-богатые» кодоны.

Высокое содержание гуанина и цитозина в целевом фрагменте может являться препятствием для получения воспроизводимых результатов ПЦР. Указанное может обуславливаться как неполным плавлением ДНК в каждом раунде амплификации, так и эффектом «проскальзывания» Таq-полимеразы на ГЦ-богатых участках ДНК-матрицы, а также эффектом супрессии ПЦР, вызванным возможным образованием внутримолекулярных дуплексов внутри ГЦ-богатых областей, препятствующих отжигу праймеров [32, 33].

Несмотря на возможность преодоления такого рода препятствий для получения целевого фрагмента, невозможно рекомендовать использование ITS-регионов для рутинной видовой диагностики тлей, как по причине трудности их получения, так и из-за возможности ошибочного вовлечения в филогенетический анализ анонимных полиморфных фрагментов ДНК, появление которых в качестве продукта ПЦР, может являться следствием «сложности» нуклеотидного состава ITS-областей у тлей.

Эффективность применения различных молекулярно-генетических маркеров для видовой диагностики тлей

Для сравнения информативности *COI* и *EF-1α* рассчитали генетические дистанции по данным маркерам для одних и тех же видов и подвидов тлей с использованием единого метода расчета генетических дистанций – метода максимального правдоподобия составных последовательностей (MCL). Данный метод был выбран в качестве универсального, поскольку алгоритм, на котором базируется этот метод, учитывает не только общее количество и картину замен в анализируемых последовательностях, но и различную вероятность замен разного типа, а именно транзиций и трансверсий, а также различных транзиций [34]. При сравнении результатов оказалось, что внутриродовые генетические дистанции, рассчитанные по *COI*, могут быть как больше, так и меньше, чем дистанции, рассчитанные на основе последовательности *EF-1α*, в зависимости от того, какой род тлей был использован для анализа. Межродовые дистанции, в то же самое время, всегда были выше, если были рассчитаны на основе последовательности *EF-1α* (таблица 3).

При анализе картины нуклеотидных замен в индивидуальных последовательностях *COI* обнаружили, что способность *COI* эффективно дифференцировать подвиды у тлей обусловлена наличием специфических для каждого подвида нуклеотидных замен (рисунок 4). Эти замены синонимичны, однако, как показывают сравнения, они обнаруживаются у представителей популяций, которые в течение длительного времени были географически изолированы друг от друга, таким образом, эти гаплотипы нельзя отнести к случайной

индивидуальной изменчивости последовательности гена *COI*, поскольку мы обнаружили, что, например, гаплотип, выявляемый у коллектированного в Беларуси *Myzus cerasi cerasi*, полностью идентичен последовательностям *Myzus cerasi* из Канады [EU701789 и EU701784], а последовательность *Myzus cerasi pruniavium* идентична последовательностям *Myzus cerasi* из Австралии [DQ499055] и Канады [EU701786, EU701790].

Таблица 3 – Матрица парных генетических дистанций для видов родов *Aphis* L., *Dysaphis* Börn. и *Brachycaudus* v.d. Goot, рассчитанная на основе последовательностей *EF-1 α* (нижняя часть матрицы) и *COI* (верхняя часть матрицы)

Номер образца, вид тлей	Номер образца										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1 <i>A. idaei</i>		0,000	–	0,075	0,111	0,083	0,073	0,107	0,118	0,114	0,110
2 <i>A. ruborum</i>	0,019		–	0,075	0,111	0,083	0,073	0,107	0,118	0,114	0,110
3 <i>A. pomi</i>	0,022	0,026		–	–	–	–	–	–	–	–
4 <i>A. fabae</i> <i>fabaе</i>	0,081	0,085	0,073		0,115	0,091	0,091	0,108	0,111	0,099	0,095
5 <i>Ph. humuli</i>	0,136	0,132	0,123	0,114		0,083	0,080	0,091	0,098	0,085	0,080
6 <i>B. helichrysi</i>	0,150	0,141	0,132	0,127	0,057		0,038	0,055	0,083	0,061	0,062
7 <i>B. tragopogonis</i>	0,150	0,141	0,132	0,127	0,073	0,026		0,055	0,079	0,072	0,076
8 <i>B. cardui</i>	0,150	0,141	0,137	0,123	0,069	0,034	0,041		0,080	0,069	0,062
9 <i>D. sorbi</i>	0,340	0,328	0,328	0,328	0,272	0,231	0,262	0,226		0,083	0,073
10 <i>D. newskyi</i>	0,370	0,352	0,358	0,370	0,310	0,279	0,300	0,263	0,081		0,035
11 <i>D. lappae</i> <i>lappae</i>	0,146	0,328	0,334	0,346	0,283	0,253	0,273	0,237	0,030	0,057	

Примечание. В верхней строке таблицы использованы номера образцов ДНК, соответствующие номерам, приведенным совместно с указанием вида тли в левом столбце.

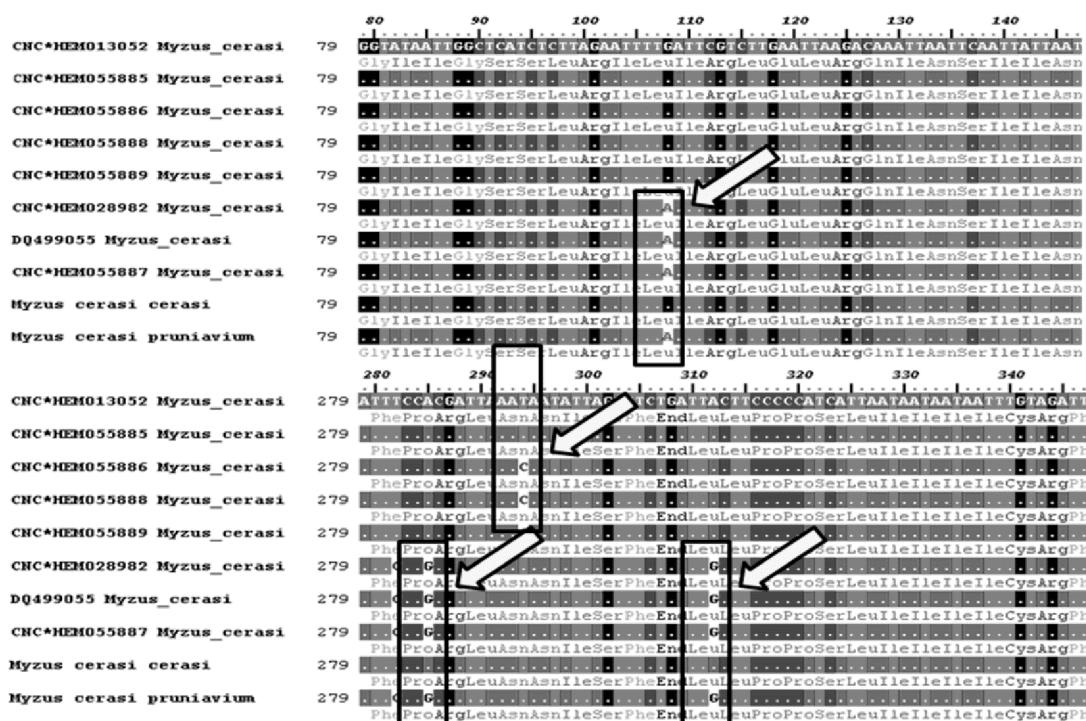


Рисунок 4 – Частичная последовательность гена *COI* подвидов *Myzus cerasi* (Fabricius, 1775) с 79 по 347 нуклеотид

При проведении аналогичного анализа последовательностей *EF-1 α* обнаружили, что информативность данного маркера на более высоком таксономическом уровне, нежели *COI*,

была обусловлена большим количеством родоспецифичных аминокислотных замен в последовательности белка, кодируемого данным геном (рисунок 5). Что никогда не наблюдается для последовательности *COI*.

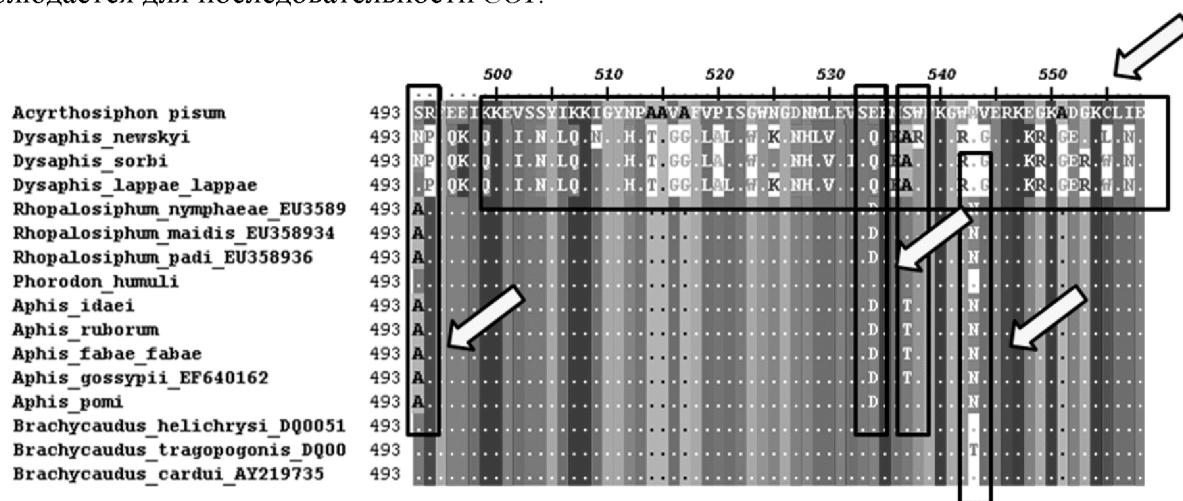


Рисунок 5 – Частичная аминокислотная последовательность гена *EF-1 α* видов и родов *Aphididae*, соответствующая фрагменту с 491 по 889 нуклеотид гомологичной мРНК (AK341330)

Суммируя результаты подбора молекулярно-генетических маркеров для видовой диагностики и филогенетических исследований тлей можно констатировать, что использованные в данном исследовании маркеры, за исключением ITS-фрагментов, могут быть применены для молекулярно-видовой диагностики тлей и филогенетических построений. Однако разрешающая возможность отдельных маркеров не одинакова, и выбор маркера должен быть соотнесен с целью каждого конкретного исследования (таблица 4).

Таблица 4 – Границы применения генетических маркеров в молекулярно-филогенетических исследованиях тлей

Маркер		Разрешающая возможность					
		Триба	Род	Вид	Подвид	Клон	Особь
мтДНК	<i>COI</i>	–	+	+	+	–	–
ядНК	<i>EF-1α</i>	+	+	+	+	–	–
	ITS*	–	–	–	–	–	–

Примечание. * – по оценке возможности использования в рутинном анализе

Следует отметить, что в литературе *COI* зачастую указывается как маркер, пригодный для анализа только (или в первую очередь) достаточно удаленных систематических групп [35]. Однако в наших исследованиях показано, что *COI* обладает достаточной информативностью для дифференциации не только видов тлей, но и подвидов, в том числе морфологически неразличимых. Данный факт, очевидно, обусловлен общей высокой изменчивостью последовательностей мтДНК в тех группах беспозвоночных, для которых характерен так называемый «взрывной» тип эволюции – образование большого количества таксонов высокого ранга (от родов до триб) за эволюционно короткий промежуток времени.

Выходы

Использование *COI* и *EF-1 α* в молекулярно-видовой диагностике тлей и геносистематических исследованиях позволяет получить отчетливый филогенетический сигнал на уровне подвидов и таксонов более высокого ранга. ITS-регионы, в силу особенностей нуклеотидного состава указанных областей генома тлей, не пригодны для рутинного применения в видовой диагностике *Aphididae*. Частичная последовательность *COI* в области, соответствующей региону с 60–70 по 500–600 нуклеотид полноразмерного гена, позволяет выявить морфологически неразличимые подвиды у тлей с высокой степенью

достоверности результата (значения индекса бутстрепа для исследованных групп превышали 70%). Частичная последовательность *EF-1 α* , включающая экзон, соответствующий участку с 491 по 889 нуклеотид гомологичной мРНК, а так же 5'-прилежащий инtron, способна поставлять филогенетический сигнал на уровне рода и выше.

Список литературы

1. Марков, А.В. Количественные закономерности макроэволюции / А.В. Марков, Е.Б. Наймарк. – Москва: Геос, 1998. – 318 с.
2. Шапошников Г.Х. Динамика клонов, популяций и видов и эволюция / Г.Х. Шапошников // Журнал общей биологии. – 1978. – Т. 39, № 1. – С. 15–33.
3. Стекольщиков, А.В. Использование нетрадиционных методов для диагностики тлей (*Homoptera, Aphidoidea*) / А.В. Стекольщиков, А.Л. Лобанов // Энтомологическое обозрение. – 1990. – Т. 69, № 2. – С. 357–373.
4. Molecular and morphological evaluation of the aphid genus *Hyalopterus* Koch (*Insecta: Hemiptera: Aphididae*), with a description of a new species / J.D. Lozier [et al.] // Zootaxa. – 2008. – Iss. 1688. – P. 1–19.
5. 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.
6. Biological identifications through DNA barcodes / P.D.N. Hebert [et al.] // Proc. R. Soc. Lond. B. – 2003. – Vol. 270, Iss. 1512. – P. 313–321.
7. Genetic evidence from mitochondrial, nuclear, and endosymbiont markers for the evolution of host-plant associated species in the aphid genus *Hyalopterus* (*Hemiptera: Aphididae*) / J.D. Lozier [et al.] // Evolution. – 2007. – Vol. 61, N. 6. – P. 1353–1367.
8. Rand, D.M. The units of selection on mitochondrial DNA / D.M. Rand // Annu. Rev. Ecol. Syst. – 2001. – Vol. 32. – P. 415–448.
9. DNA barcodes to explore diversity in aphids (Hemiptera Aphididae and Adelgidae) / R.G. Foottit [et al.] // Redia. – 2009. – Vol. 92. – P. 87–91.
10. The current state of insect molecular systematic: a thriving tower of babel / M.S. Caterino [et al.] // Annu. Rev. Entomol. – 2000. – Vol. 45. – P. 1–54.
11. Gulbitti Onarici, S. Protein and DNA in Systematic Biology / S. Gulbitti Onarici, S. Sumer // Turk. J. Biol. – 2003. – Vol. 27. – P. 47–55.
12. Банникова, А.А. Молекулярные маркеры и современная филогенетика млекопитающих / А.А. Банникова // Журнал общей биологии. – 2004. – Т. 65, № 4. – С. 278–305.
13. How do insect nuclear ribosomal genes compare to protein-coding genes in phylogenetic utility and nucleotide substitution patterns? / B.N. Danforth [et al.] // Systematic Entomology. – 2005. – Vol. 30, Iss. 4. – P. 549–562.
14. Cruickshank, R.H. Molecular markers for the phylogenetics of mites and ticks / R.H. Cruickshank // Systematic & Applied Acarology. – 2002. – Vol. 7. – P. 3–14.
15. Cook, L.G. The gall-inducing habit has evolved multiple times among the eriococcid scale insects (Sternorrhyncha: Coccoidea: Eriococcidae) / L.G. Cook, P.J. Gullan // Biological Journal of the Linnean Society. – 2004. – Vol. 83. – P. 441–452.
16. Light, J.E. Cophylogeny and disparate rates of evolution in sympatric lineages of chewing lice on pocket gophers / J.E. Light, M.S. Hafner // Molecular Phylogenetics and Evolution. – 2007. – doi:10.1016/j.ympev.2007.09.001. – P. 1–17.
17. Evolutionary conservation and versatility of a new set of primers for amplifying the ribosomal internal transcribed spacer regions in insects and other invertebrates / Y.J. Jie [et al.] // Molecular Ecology Notes. – 2003. – Vol. 3. – P. 581–585.
18. Ваулин, О.В. Географическая изменчивость ITS2 рДНК и *COI* мтДНК и криптические виды малярийного комара *Anopheles messeae* Fall. (Diptera: Culicidae) / О.В. Ваулин, Ю.М. Новиков // Вестник ВОГиС. – 2010. – Т. 14, № 3. – С. 546–557.
19. Rakauskas, R. *Brachycaudus divaricatae* Shaposhnikov, 1956 in Europe: biology, morphology and distribution, with comments on its taxonomic position (Hemiptera,

- Sternorrhyncha: Aphididae) / R. Rakauskas, J. Turcinaviciene // Mitt. Mus. Nat.kd. Berl. Zool. Reihe. – 2006. – Vol. 82, N. 2. – P. 248–260.
20. Fenton, B. A study of variation in rDNA ITS regions shows that two haplotypes coexist within a single aphid genome / B. Fenton, G. Malloch, F. Germa // Genome. – 1998. – Vol. 41. – P. 337–345.
21. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics / T.J. White [et al.] // PCR Protocols: a guide to methods and applications / Eds. M.A. Innis [et al.]. – New York: Academic Press, 1990. – P. 315–322.
22. Validity reassessment of *Trichobilharzia* species using *Lymnaea stagnalis* as the intermediate host / J. Rudolfova [et al.] // Parasitol. Res. – 2005. – Vol. 95, N. 2. – P. 79–89.
23. Evolutionary conservation and versatility of a new set of primers for amplifying the ribosomal internal transcribed spacer regions in insects and other invertebrates / Y.J. Jie [et al.] // Molecular Ecology Notes. – 2003. – Vol. 3. – P. 581–585.
24. High-fidelity PCR assay discriminates between immature *Lipolexis oregmae* and *Lysiphlebus testaceipes* (Hymenoptera: Aphidiidae) within their aphid hosts / A.B. Persad [et al.] // Florida Entomologist. – 2004. – Vol. 87, N. 2. – P. 18–24.
25. Лукашов, В.В. Молекулярная эволюция и филогенетический анализ / В.В. Лукашов. – Москва: Бином, 2009. – 256 с.
26. Funk, D.J. Species-level paraphyly and polyphyly: frequency, causes, and consequences, with insights from animal mitochondrial DNA / D.J. Funk, K.E. Omland // Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst. – 2003. – Vol. 34. – P. 397–423.
27. Holman, J. Host plant catalog of aphids. Palaearctic region / J. Holman // Berlin: Springer Science, 2009. – 1216 pp.
28. Blakman, R.L. Aphids of the world trees. An identification and information guide / R.L. Blakman, V.F. Eastop. – London: CAB International, 1994. – 1024 pp.
29. Rakauskas, R. Biosystematic studies of Lithuanian aphids (Hemiptera, Sternorrhyncha: Aphididae) / R. Rakauskas. – Lithuania, 2000. – 128 pp.
30. Dres, M. Host races in plant-feeding insects and their importance in sympatric speciation / M. Dres, J. Mallet // Phil. Trans. R. Soc. Lond. B. – 2002. – Vol. 357. – P. 471–492.
31. Heie, O.E. The *Aphidoidea* (Hemiptera) of Fennoscandia and Denmark. IV / O.E. Heie // Fauna Entomologica Skandinavica. – 1992. – Vol. 25. – 188 pp.
32. Kibbe, W.A. OligoCalc: an online oligonucleotide properties calculator / W.A. Kibbe // Nucleic Acids Research. – 2007. – Vol. 35. – P. 43–46.
33. Буздин, А.А. Полногеномные подходы к функциональному анализу повторяющихся элементов: автореферат диссертации на соискание степени доктора биологических наук: 03.00.03 / А.А. Будзин, ИБОХ РАН. – Москва, 2008. – 226 с.
34. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method / K. Tamura [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2004. – Vol. 101, N. 30. – P. 11030–11035.
35. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates / O. Folmer [et al.] // Molecular Marine Biology and Biotechnology. – 1994. – Vol. 3, N. 5, – P. 294–299.

SELECTION OF THE GENETIC MARKERS FOR THE APHID SPECIES DETECTION AND PHYLOGENETIC RECONSTRUCTION

N.V. Voronova, V.P. Kurchenko, S.V. Buga
Belarusian State University, Minsk, Belarus

Using of COI and EF-1 α as phylogenetic markers in taxonomy research allows getting the clear phylogenetic signal on the subspecies level and higher. It is fined out that ITS-regions are not suitable for the routine applications in aphid species detection.