

ISSN 0002-354X

ДОКЛАДЫ

НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ
НАУК БЕЛАРУСИ

ТОМ 55



6

НОЯБРЬ – ДЕКАБРЬ

2011

БИОЛОГИЯ

УДК 595.752.2:577.858:57.088.1

Н. В. ВОРОНОВА, В. П. КУРЧЕНКО, С. В. БУГА

**ЭФФЕКТИВНОСТЬ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ
МАРКЕРОВ С ЯДЕРНОЙ ЛОКАЛИЗАЦИЕЙ В ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИХ
ИССЛЕДОВАНИЯХ ТЛЕЙ (RHYNCHOTA : HOMOPTERA : APHIDIDAE)**

(Представлено академиком Н. А. Картелем)

Белорусский государственный университет, Минск

Поступило 15.08.2011

Введение. Семейство настоящих тлей (*Aphididae*) включает большое количество «проблемных» форм и групп: видов с неясным таксономическим положением; родов, четкие границы между которыми не удастся установить; и таксонов более высокого ранга, таких как трибы, состав которых не ясен и требует ревизий. Для дифференциации видов тлей и установления филогенетических отношений между таксонами используют молекулярно-генетические маркеры, представляющие собой участки генов или межгенные спейсеры, для которых показано, что скорость эволюции геномов по этим областям положительно коррелирует со скоростью эволюции таксонов, которую можно оценить с использованием иных критериев: морфологического, экологического и др. [1].

Филогенетические исследования насекомых традиционно основываются на сравнении нуклеотидных последовательностей митохондриальных генов. Однако по многим данным [2] ядерные гены обеспечивают более устойчивый филогенетический сигнал на протяженных участках временной шкалы из-за меньшего его экранирования возможными гомоплазиями (как неоднократными прямыми, так и обратными заменами), что чрезвычайно важно на надвидовом уровне.

Субъединица α фактора элонгации 1 (*EF-1 α*) – один из наиболее перспективных ядерных маркеров, использующийся в геносистематике и филогении насекомых [3; 4]. Факторы элонгации – семейство высоко консервативных белков, экспрессирующихся во всех живых клетках и обеспечивающих элонгацию белковых цепей на рибосомах. Анализ нуклеотидной последовательности *EF-1 α* предоставляет информацию, которая может быть использована как для дифференциации родов, так и для диагностики видов внутри рода, в том числе близких [5].

Гены рибосомальных РНК (рДНК) широко используются в эволюционном анализе насекомых. Сами гены рРНК, являясь эволюционно консервативными, предоставляют удобные сайты для связывания праймеров, в то время как находящиеся между ними некодирующие межгенные спейсеры (ITS) представляют собой высоко вариативные области, удобные для применения в филогенетических исследованиях, в том числе близких таксонов, идентификации криптических видов, а также в популяционных и филогеографических исследованиях. ITS-регионы представляют собой последовательности, располагающиеся между генами 18S и 5,8S (ITS1), а также 5,8S и 28S рРНК (ITS2). Нуклеотидный состав и размеры ITS-регионов у эукариот разных таксономических групп существенно отличаются. В частности, рядом исследователей показано, что изменчивость длин ITS регионов даже у видов одного рода настолько высока, что длина амплифицируемого участка может служить критерием видовой диагностики [6].

Цель работы – оценка применимости маркеров *EF-1 α* и ITS для видовой диагностики тлей.

Материалы и методы исследования. Сборы тлей исследуемых видов провели в 2008–2010 гг. Данные об исследованных энтомологических образцах представлены в табл. 1.

Таблица 1. Афилологический материал, использованный в исследовании

Вид	Шифр сбора	Дата сбора	Растение-хозяин	Место сбора	Код Gen-Bank
<i>Aphis fabae fabae</i> Scop.	10–43	15.08.2010	<i>Chenopodium album</i> L.	Беларусь, Минский р-н, п. Крыжовка	JF950583
<i>Aphis idaei</i> v. d. Goot	10–454	09.07.2010	<i>Rubus idaeus</i> L.	Беларусь, Столбцовский р-н, окр. д. Слобода	JF950580
<i>Aphis ruborum</i> Börn.	10–504	14.07.2010	<i>Rubus caesius</i> L.	Беларусь, Минская обл., Столбцовский р-н, окр. д. Клешище	JF950581
<i>Aphis pomi</i> d. Geer	10–09	30.06.2010	<i>Malus domestica</i> Borch.	Беларусь, Минский р-н, д. Прилуки	JF950582
<i>Dysaphis sorbi</i> (Kalt.)	10–42	09.08.2010	<i>Sorbus aucuparia</i> L.	Беларусь, Минский р-н, п. Крыжовка	JF950577
<i>Dysaphis lappae lappae</i> (Koch)	10138	27.07.2010	<i>Arctium lappa</i> L.	Россия, Майамский р-н, п. Рыбалка	JF950578
<i>Dysaphis newskyi</i> (Börner)	10084	04.07.2010	<i>Heracleum</i> sp.	Россия, Турочакский р-н, п. Артыбаш	JF950584
<i>Phorodon humuli</i> Schrk.	10–01	30.06.2010	<i>Prunus armeniaca</i> L.	Беларусь, Минский р-н, д. Прилуки	JF950579

Для выделения ДНК использовали DNA Purification Kit (Fermentas). ПЦР проводили в стандартных условиях с праймерами: IF-1aF/EF-1aR (*EF-1a*) [7]; B/C (ITS1) [8]; ITS5/ITS4, its3Trem/its2Trem (ITS1-5.8S-ITS2) [9; 10]; CAS5p8sFc/CAS28sB1d, 5.8S-F/28S-R (ITS2) [11; 12].

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. При расчете GD и построении дендрограмм были также использованы последовательности иных видов тлей, полученные из GenBank (NCBI) [13]. Идентификационные коды данных последовательностей указаны на рисунке. 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 [14].

Результаты и их обсуждение. *Использование EF-1a в видовой диагностике тлей.* Филогенетическую информативность *EF-1a* оценили по результатам сравнения последовательности фрагмента гена *EF-1a* длиной 493 п. н. для 11 видов тлей, принадлежащих к 4 родам 2 триб. В частности, провели расшифровку *EF-1a* для *A. idaei*, *A. ruborum*, *A. fabae fabae*, *A. pomi*, *Ph. humuli*, *D. sorbi*, *D. newskyi*, *D. lappae lappae*. Еще три последовательности *EF-1a* тлей рода *Brachycaudus* получили из GenBank [13]. Исследованный фрагмент гена включал экзон, гомологичный участку с 491 по 889 нуклеотид соответствующей мРНК (AK341330), а также 5'-прилежащий высоко-вариабельный участок длиной 94 нуклеотида, представляющий собой концевой фрагмент интрона гена *EF-1a*.

Для исследуемой группы тлей рассчитали величины генетических дистанций, представленные в табл. 2.

При этом обнаружили, что внутривидовые генетические дистанции, рассчитанные по данному маркеру, соизмеримы с GD, полученными на основе сравнения последовательностей гена субъединицы 1 цитохромоксидазы *c* (*COI*), который в настоящее время является наиболее широко применимым филогенетическим маркером. В частности, средняя дистанция между видами

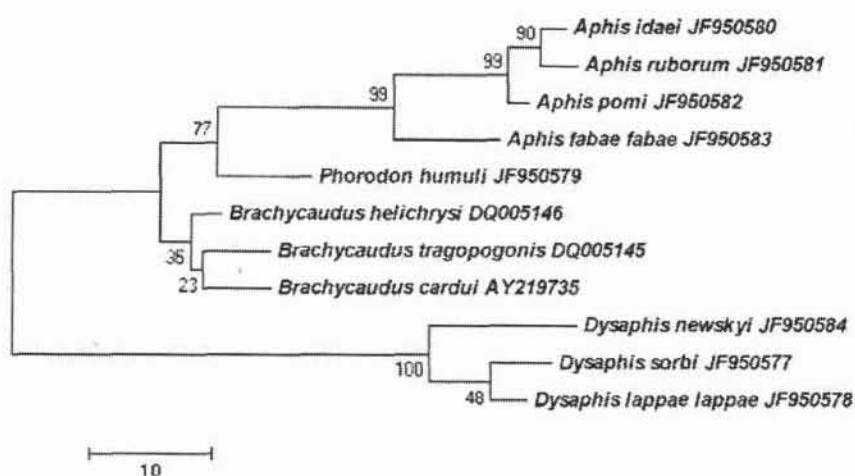
Таблица 2. Матрица попарных генетических дистанций для видов родов *Aphis* L., *Dysaphis* Börn. и *Brachycaudus* v.d. Goot, рассчитанная на основе последовательностей *EF-1a* (нижняя часть матрицы) и *COI* (верхняя часть матрицы)

Вид	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 fabae</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 lappae</i>	0,146	0,328	0,334	0,346	0,283	0,253	0,273	0,237	0,030	0,057	

рода *Dysaphis* Börn. составила 0,054, между видами рода *Brachycaudus* v. d. Goot – 0,034, а между отдельными видами рода *Aphis* L. средняя дистанция была равна 0,051. В то же время генетические дистанции 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-1a* даже между сестринскими родами. Данный факт может быть обусловлен включением в анализ не только белоккодирующей последовательности, но и частично 5'-прилежащего интрона. Интроны, которые не находятся под прямым действием отбора, способны накапливать и сохранять в ряду поколений большее число замен во всех трех позициях кодонов, нежели консервативные белоккодирующие последовательности.

При построении филограммы с использованием последовательности *EF-1a* происходит достоверное отделение родов, как это представлено на рисунке.

Принято считать, что у всех организмов митохондриальные гены, к которым относится *COI*, менее консервативны, чем гены ядерной ДНК (в данном случае – *EF-1a*) [2]. Однако в нашем случае, при включении в анализ участка, соответствующего интрону, GD между отдельными видами и родами оказались существенно выше, чем это было ранее показано для *COI*. Получаемые



Дендрограмма филогенетических взаимоотношений тлей родов *Aphis* L., *Dysaphis* Börn. и *Brachycaudus* v. d. Goot, построенная с использованием метода «минимума эволюции» на основе анализа последовательности *EF-1a*

с использованием *EF-1a* значения генетических дистанций указывают на принципиальную возможность использования данного маркера на уровне выше родового.

Использование ITS-регионов в видовой диагностике тлей. При получении фрагментов ITS были опробованы все пары праймеров, а также их различные сочетания [7–12]. 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, 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 электрофореграмме. Указанный 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 [10].

При попытке определить причину 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* (Sulz.). В процессе анализа нуклеотидных последовательностей рассчитали содержание ГЦ-пар, а также 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 %.

Как свидетельствуют данные, представленные в табл. 3, столь высокое содержание ГЦ-пар в ITS-областях, очевидно, является специфической особенностью генома тлей, не свойственной большинству других насекомых. 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, наблюдаемое для насекомых других таксономических групп.

Таблица 3. Процентное содержание гуанина и цитозина в ITS-регионах насекомых разных таксонов

Таксон	Вид	Фрагмент	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> (Sulz.)	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: 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» Taq-полимеразы на ГЦ-богатых участках ДНК-матрицы, а также эффектом супрессии ПЦР, вы-

званным возможным образованием внутримолекулярных дуплексов внутри ГЦ-богатых областей, препятствующих отжигу праймеров [15].

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. 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. Границы применимости исследованных молекулярно-генетических маркеров отображены в табл. 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 отдельно отметить, что последовательность *EF-1α*, включающая экзон и интрон, обладает большей разрешающей способностью при работе с таксонами тлей надвидового уровня, чем последовательность *COI*. Данный факт особенно важен при работе с крупными таксонами, в которых эффект «насыщения» последовательности ДНК синонимичными нуклеотидными заменами сказывается наиболее сильно [2].

Заключение. Использование *EF-1α* в молекулярно-видовой диагностике тлей и геносистематических исследованиях позволяет получить отчетливый филогенетический сигнал на уровне видов 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*. Последовательность *EF-1α*, при условии включения в анализ интронов данного гена, обладает большей разрешающей способностью при работе с таксонами тлей надвидового уровня, чем последовательность *COI*.

Литература

1. Foottit R. G. et al. // Redia. 2009. Vol. 92. P. 87–91.
2. Банникова А. А. // Журн. общей биологии. 2004. Т. 65, № 4. С. 278–305.
3. Caterino M. et al. // Annu. Rev. Entomol. 2000. Vol. 45 P. 1–54.
4. Light J. E. et al. // Mol. Phyl. & Evol. 2007. doi:10.1016/j.ympev.2007.09.001. P. 1–17.
5. Cho S. et al. // Mol. Biol. Evol. 1995. Vol. 12. P. 650–656.
6. Семунова С. К. et al. // Genetika. 2005. Т. 41, № 1. P. 17–22.
7. Rakauskas R. et al. // Mitt. Mus. Nat.kd. Berl. Zool. Reihe. 2006. Vol. 82, № 2. P. 248–260.
8. Fenton B. et al. // Genome. 1998. Vol. 41. P. 337–345.
9. White T. J. et al. // PCR Protocols: a guide to methods and applications. 1990. P. 315–322.
10. Rudolfova J. et al. // Parasitol. Res. 2005. Vol. 95. P. 79–89.
11. Jie Y. J. et al. // Molecular Ecology Notes. 2003. Vol. 3. P. 581–585.
12. Persad A. B. et al. // Florida Entomologist. 2004. Vol. 87, № 2. P. 18–24.
13. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>