

**ВОРОБЬЕВА М.М.** ✉, **СУПРАНОВИЧ П.К.**, **ВОРОНОВА Н.В.***Белорусский государственный университет,**Беларусь, 220030, г. Минск, пр. Независимости, 4, e-mail: varabmm@bsu.by*✉ *masch.89@mail.ru, +37544-550-91-33*

## ГЕНЕТИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА ВИДА *MACROSIPHUM GEI* KOCH, 1855, В БЕЛАРУСИ

В настоящее время в мире зарегистрировано большое количество видов и подвидов насекомых, многие из которых принадлежат к числу опасных вредителей сельскохозяйственных, плодово-ягодных, лекарственных и декоративных растений. Огромный интерес среди них представляют настоящие тли, освоившие практически все виды растений в качестве кормовых объектов [1].

Как известно, тли – это группа насекомых, относящаяся к числу наиболее жестко детерминированных в отношении выбора растения-хозяина. Отношения тлей и их кормовых растений во многом близки к отношениям «паразит – хозяин», причем степень зависимости тлей от наличия кормового растения конкретного вида на «правильной» стадии вегетативного цикла граничит с возможностью биологического выживания. Тем не менее, эта зависимость не абсолютна. Большинство известных видов тлей являются олигофагами и способны питаться на нескольких растениях близких родов. Эта способность позволяет тлям при благоприятных условиях мигрировать на другие растения того же семейства, формировать необходимые адаптации под действием жесткого движущего отбора и в итоге расширять спектр доступных кормовых ресурсов [2]. Как принято считать, именно такого рода процессы приводят к появлению новых подвидов, а при возникновении экологической изоляции – и видов тлей.

В середине XX века советский энтомолог Г.Х. Шапошников провел ряд экспериментов по смене кормовых растений у трех видов тлей. В результате было установлено, что искусственные пересадки тлей с типичного кормового растения на систематически близкое, но не входящее в перечень кормовых растений, через несколько поколений приводит к формированию морфологически измененной, репродуктивно изолированной формы. Предполагается, что это возможно благодаря облигатному партеногенезу, что приводит к быстрому отбору не отдельных

особей, а целых клонов мутантов, несущих важные адаптивные признаки. В природе процессы видообразования у тлей могут протекать по сходному сценарию. После длительного периода адаптации к новому кормовому растению может происходить изоляция отдельных форм, ассоциированных с разными кормовыми растениями, что приводит к внутривидовому полиморфизму или образованию новых видов [3]. Поскольку процессы, сходные с видообразованием у тлей, можно наблюдать, что называется, в эксперименте, можно сказать, что тли являются интересным и важным объектом для изучения микроэволюционных процессов у насекомых.

При изучении процессов видообразования у насекомых используют молекулярно-генетические маркеры, представляющие собой частичные последовательности более или менее консервативных областей генома. Митохондриальная ДНК – часть генома, наиболее широко используемая для дифференциации видов животных, а также для анализа внутривидового полиморфизма. Однако известно, что консервативность этой области генома у тлей настолько велика, что гомология ортологичных последовательностей у видов одного рода может достигать 99%, что не позволяет достоверно оценить изменения, происходящие на внутривидовом уровне [4]. Близкородственные виды тлей, подвергшиеся дивергенции сравнительно недавно, требуют привлечения более вариабельных ДНК-маркеров. В настоящее время для изучения внутривидовых процессов наиболее востребованы микросателлитные повторы (STR), представляющие собой области тандемно повторяющихся ди-, три- или тетрануклеотидных мотивов, равномерно диспергированных в эухроматиновой части геномов эукариот. Эти маркеры используются при проведении детального анализа популяционной и видовой структуры у тлей, а также для выявления различий между популяциями, видами или единичными особями [5].

Для изучения процессов видообразования в связи с ассоциацией с конкретным кормовым растением нами был выбран в качестве модельного вид тлей *Macrosiphum gei* Koch, 1855, состоящий в Беларуси из комплекса форм, связанных с разными кормовыми растениями. В наших ранних работах мы показали, что в Беларуси эти тли ассоциированы с гравилатом городским (*Geum urbanum* L.), бутеном ароматным (*Chaerophyllum aromaticum* L.), снытью обыкновенной (*Aegopodium podagraria* L.) и купырем лесным (*Anthriscus sylvestris* L.), причем как морфологически, так и по последовательности митохондриального гена субъединицы 1 цитохром-с-оксидазы (COI) формы, собранные с разных кормовых растений, явственно различаются. Мы предположили, что в настоящее время происходит дивергенция этого вида тлей на несколько самостоятельных групп в соответствии с предпочитаемым кормовым растением, поскольку все четыре растения существенно различаются составом вторичных метаболитов [6]. По нашему мнению, наличие в перечне вторичных метаболитов бутеня ароматного большого числа токсичных для насекомых веществ может быть причиной изоляции линий, питающихся на бутене. Однако поскольку, как было сказано, последовательность гена COI из-за чрезвычайно высокой консервативности не всегда отображает процессы, проходящие на внутривидовом уровне, в рамках настоящего исследования мы изучили генетическую структуру вида и изменчивость тлей *M. gei*, ассоциированных с четырьмя разными кормовыми растени-

ями, с использованием, в первую очередь, данных микросателлитного анализа.

### Материалы и методы

Сборы тлей исследуемого вида проводили на протяжении 6 последовательных лет (2009–2015 гг.) на модельной территории, а именно на территории памятника природы «Дубрава» (Минский р-н, Беларусь) с четырех разных кормовых растений: гравилата городского, бутеня ароматного, сныти обыкновенной и купыря лесного.

Для выделения ДНК использовали набор DNA Purification Kit (Thermo scientific), адаптировав методику производителя для работы с единичными насекомыми.

Аmplification гена COI провели с использованием праймеров, представленных в табл. 1 [7, 8]. В результате амплификации участка COI были получены фрагменты длиной 453 п.н. в области с 79 по 531 нуклеотид полного гена. ПЦР осуществляли в режиме: 94 °C – 3 мин; 35 циклов по 94 °C – 20 сек, 50 °C – 30 сек, 72 °C – 90 сек; 72 °C – 5 мин. Для микросателлитного анализа использовали праймеры, предложенные Рабуди и соавторами [9] (табл. 1). ПЦР для получения STR-фрагментов проводили в режиме: 94 °C – 2 мин; 40 циклов по 94 °C – 1 мин, 54 °C – 1 мин, 72 °C – 1 мин; 72 °C – 5 мин. Реакционная смесь содержала в 25 мкл: 200 мкМ dNTP, 1 мМ праймера, 2,5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 1 × Taq Buffer (10 мМ Tris-HCl, 50 мМ KCl, 0,8% Nonidet P40), 1U Taq-полимеразы, 0,5 мкг ДНК-матрицы.

Таблица 1

### Праймеры, использованные в исследовании

Праймеры, использованные для получения фрагмента COI		
Название	Последовательность, 5'–3'	
HCO2198	TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA	
LCO1490	GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG	
LepR	ATTCAACCAATCATAAAGATATTGG	
LepF	TAAACTTCTGGATGTCCAAAAAATCA	
Праймеры, использованные для получения STR-фрагментов		
Название	Мотив локуса	Последовательность, 5'–3'
Me1	(GT)17	TTCGCGAAAACTTTATGACC TCGCTGCGTTCCTATACTACC
Me5	(CT)14	GCAAATATTAAGGGTACAG CCAATTAAACAACCTTCGTGG
Me7	(AC)13	TTAAGTCACTGCCGGTTTCG ATTAGCTCGAGCTCGTAC
Me9	(TG)14	AGCGAAACCTCCCCTAATAG GCACAAATAAGCTCGAGTGC



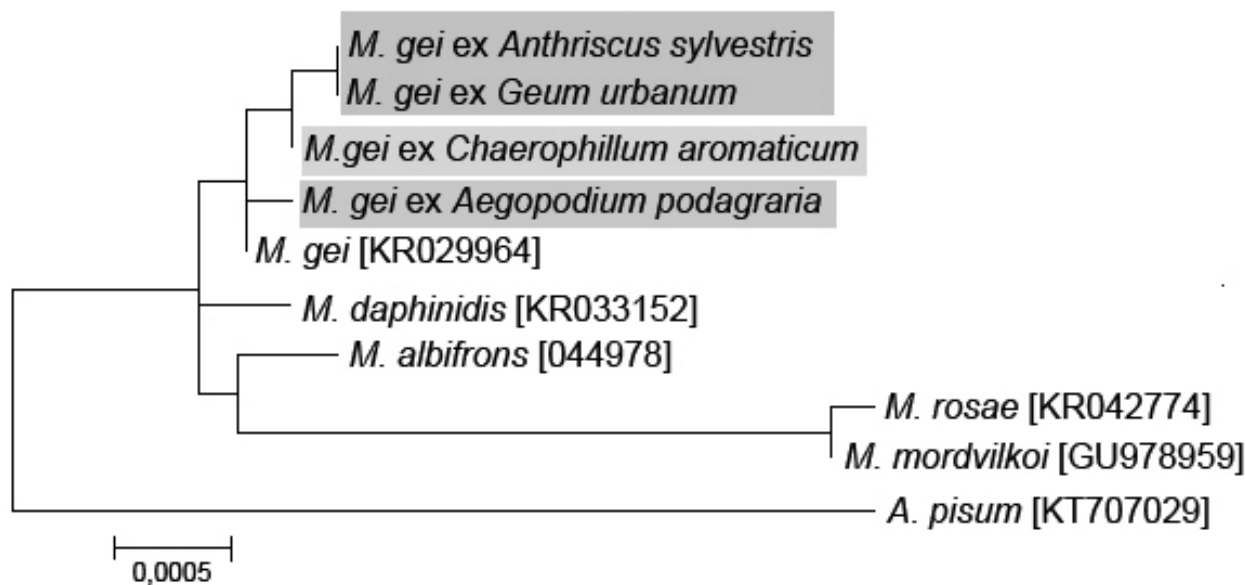


Рис. 2. Дендрограмма филогенетических взаимоотношений видов тлей рода *Macrosiphum*, построенная с использованием метода максимального правдоподобия (ML)

На дендрограмме все образцы *M. gei* образовали единую группу. Дополнительная последовательность, полученная исследователями Великобритании, также не отличалась от «белорусских», несмотря на географическую удаленность.

Сравнительный анализ микросателлитных локусов «белорусских» тлей *M. gei* провели по четырем низкоаллельным локусам (табл. 1), из которых наиболее вариабельными оказались локусы Me7 и Me9, в то время как по локусу Me1 вариабельности выявлено не было. Образцы тлей, собранные со всех кормовых растений, имели одинаковую длину STR-фрагментов по локусу Me1 (150 п.н.), в то время как по локусам Me5 (100–110 п.н.), M7 (179–190 п.н.) и Me9 (150–160 п.н.) размеры фрагментов незначительно варьировали. У образцов, собранных с бутеня ароматного, длины фрагментов отличались по двум локусам, а именно Me7 (200–240 п.н.) и Me9 (180–200 п.н.). В настоящем исследовании

не было выявлено носителей уникальных аллелей среди образцов *M. gei* ни по одному из исследованных локусов.

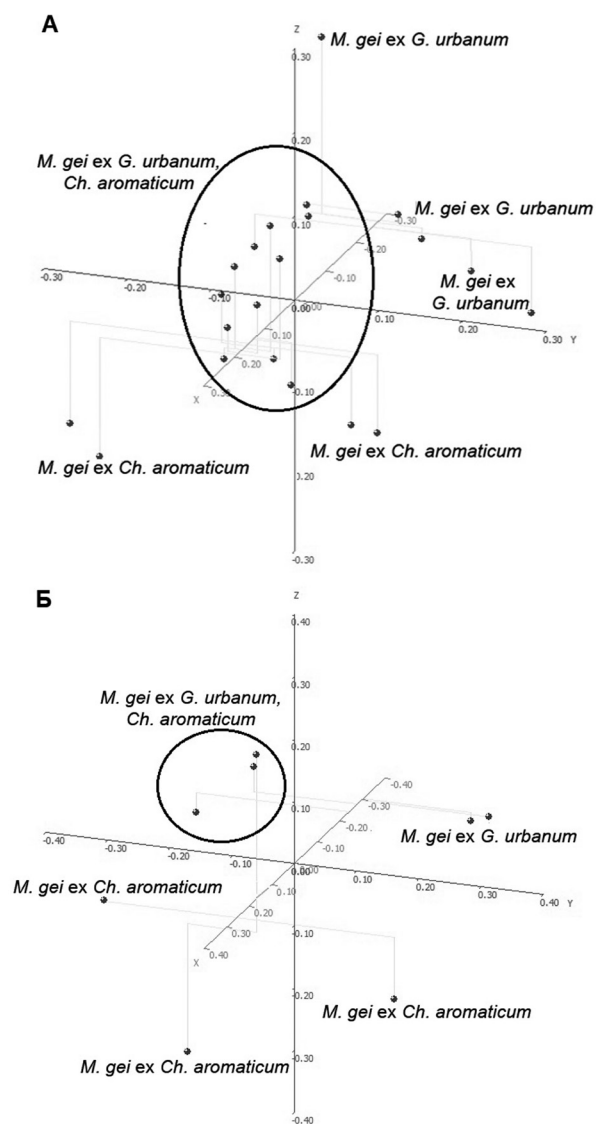
Среди четырех исследованных форм *M. gei* наибольший интерес, по нашему мнению, представляют тли с гравилата городского – титульного кормового растения *M. gei* и бутеня ароматного как растения, наиболее отличающегося по составу вторичных метаболитов от гравилата городского. Для того чтобы оценить уровень различия между этими тлями, мы рассчитали парные генетические дистанции отдельно для образцов тлей *M. gei*, коллектированных в Беларуси с гравилата городского и бутеня ароматного (табл. 2).

Как оказалось, значения генетических дистанций по каждому локусу между образцами с бутеня ароматного незначительно превышали значения генетических дистанций между образцами, собранными с гравилата городского, однако эти различия находились в пределах статисти-

Таблица 2

Генетические дистанции, рассчитанные по исследованным STR-локусам, между *Macrosiphum gei* Koch, коллектированными в Беларуси с гравилата городского и бутеня ароматного

Локус	Генетические дистанции	
	сборы тлей с гравилата городского, мин. – макс. (средн.)	сборы тлей с бутеня ароматного, мин. – макс. (средн.)
Me5	0,00000–0,66667 (0,45006)	0,00000–0,67937 (0,43861)
Me7	0,00000–0,59914 (0,42408)	0,00000–0,60945 (0,43885)
Me9	0,00000–0,66667 (0,44946)	0,00000–0,69749 (0,46951)



**Рис. 3.** Результаты анализа сходства микросателлитных локусов Me7 и Me9 тлей *Macrocephalus gei* Koch

ческой ошибки. Полученные данные свидетельствуют об общем низком уровне генетической вариабельности по всем STR-локусам у тлей *M. gei*.

Результаты координатного анализа всей выборки по локусам Me7 и Me9 показали, что образцы, собранные с гравилата городского и бутеня ароматного, на графике могут образовывать единую группу (рис. 3). Это указывает на отсутствие принципиальных различий по количеству аллелей, длине STR-локусов и значениям генетических дистанций между этими образцами. Кроме того, на графике обнаруживаются отделившиеся от группы единичные образцы, среди которых были как принадлежащие к форме с бутеня ароматного, так и образцы с гравилата городского. В общем случае по STR-локусам тли с бутеня ароматного оказались несколько более вариабельны, чем тли с гравилата городского. Исключение составил локус Me5.

### Выводы

Тли *M. gei* в условиях Беларуси образуют комплекс, внутри которого выделяются формы, ассоциированные с конкретными кормовыми растениями и демонстрирующие некоторые генетические различия. Всего в Беларуси у *M. gei* было выявлено 2 гаплотипа COI, причем один был отмечен у тлей, собранных с бутеня ароматного и сныти обыкновенной, т.е. растений с высоким содержанием токсичных вторичных метаболитов, а второй – у насекомых с купыря лесного и гравилата городского, для которых ранее было показано меньшее содержание веществ с инсектицидной активностью. Анализ последовательностей COI показал высокий процент сходства (98%) между образцами, собранными со всех четырех кормовых растений.

Анализ микросателлитных локусов указывает на наличие генетических различий по двум локусам (Me7 и Me9) между образцами, собранными с гравилата городского и бутеня ароматного. Уровень генетической вариабельности по всем STR-локусам у тлей *M. gei*, собранных с разных кормовых растений, был невысоким.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Буга С.В. Тли (Homoptera, Aphididae) – вредители традиционных плодовых культур в условиях Беларуси: современное состояние и тенденции изменения состава и вредоносности // Плодоводство и ягодоводство России. – 2013. – 36, № 1. – С. 64–69.
2. Thieme T., Truberg B., Dixon A.F.G. Phenotypic plasticity in the response of aphids to host plant quality // European Journal of Environmental Sciences. – 2014. – 4, № 2. – P. 92–96.
3. Шапошников Г.Х. Специфичность и возникновение адаптации к новым хозяевам у тлей (Homoptera, Aphidoidea) в процессе естественного отбора (экспериментальное исследование) // Энт. обозр. – 1961. – XL, № 4. – С. 739–762.
4. Lagos-Kutz D., Favret C., Giordano R., Voegtlin D.J. Molecular and morphological differentiation between *Aphis gossypii* Glover (Hemiptera, Aphididae) and related species, with particular reference to the North American Midwest // Zookeys. – 2014. – 459. – P. 49–72.
5. Margaritopoulos J.T., Malarky G., Tsitsipis J.A., Blackman R.L. Microsatellite DNA and behavioral studies provide evidence of host-mediated speciation in *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae) // Biological J. of the Linnean Society. – 2007. – 91, № 4. – P. 687–702.
6. Воронова Н.В., Буга С.В., Курченко В.П. Генетический полиморфизм в комплексе *Macrosiphum gei* Koch, 1855 (Rhynchota: Homoptera: Aphididae) // Труды БГУ. Серия «Генетика». – 2010. – 5, ч. 1. – С. 171–177.
7. Folmer O., Black M., Hoeh W., Lutz R., Vrijenhoek R. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates // Molecular Marine Biology and Biotechnology. – 1994. – 3, № 5. – P. 294–299.
8. Hajibabae M., Janzen D.H., Burns J.M., Hallwachs W., Hebert P.D.N. DNA barcodes distinguish species of tropical Lepidoptera // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2006. – 103. – P. 968–971.
9. Raboudi F., Marrakchi M., Chavigny P., Vanlerberghe-Masutti F. Characterization of polymorphic microsatellite loci in the aphid species *Macrosiphum euphorbiae* (Hemiptera: Aphididae) // Molecular Ecology Notes. – 2005. – 5, № 3. – P. 490–492.
10. Воронова Н.В., Буга С.В., Курченко В.П. Выявление криптических подвидов в эволюционно молодых группах тлей (Rhynchota: Homoptera: Aphididae) с использованием гена субъединицы I цитохромоксидазы с (*COI*) в качестве филогенетического маркера // Доклады НАН Беларуси. – 2011. – 55, № 3. – С. 97–102.

VARABYOVA M.M., SUPRANOVICH P.K., VORONOVA N.V.

Belarusian State University,

Belarus, 220045, Minsk, Kurchatova str., 10, e-mail: varabmm@bsu.by

#### GENETIC STRUCTURE OF SPECIES OF *MACROSIPHUM GEI* KOCH, 1855, IN BELARUS

**Aim.** Aphids *Macrosiphum gei* Koch, 1855, are interesting objects for studying of speciation processes, because they are represented as a complex of forms in Belarus, that associated with different forage plants, viz *Geum urbanum* L., *Chaerophyllum aromaticum* L., *Aegopodium podagraria* L., *Anthriscus sylvestris* L. Moreover, according to previously conducted studies, these forms differ in morphological signs and mitochondrial sequences gene COI. **Methods.** Methods for analysis of non-coding (STR) and highly conserved (COI) DNA were used to study the level of genetic structure of species and variability of aphids *M. gei*. **Results.** The analysis of nucleotide sequences of COI aphids, collected from different forage plants, revealed two haplotypes. The first one was seen in aphids collected from *Ch. aromaticum* and *A. podagraria*, and the second one was seen in aphids collected from *G. urbanum* and *A. sylvestris*. In the analysis of phylogenetic relationships determined that the aphid *M. gei* generates a complex inside of which different forms educes, that are associated with different forage plants. The analysis of microsatellite loci is an evidence of genetic differences between the samples collected from *Ch. aromaticum* and *G. urbanum*. **Conclusions.** These results allow us to assume that there is a currently divergence of aphids *M. gei* several independent groups in accordance with the preferred food plant.

**Keywords:** aphids, *Macrosiphum gei* Koch, genetic variability, microsatellite loci, COI.