

УНИВЕРСАЛЬНЫЕ RAPD- И ISSR-ПРАЙМЕРЫ ДЛЯ ПЦР-АНАЛИЗА КЛОПОВ-КРУЖЕВНИЦ (HETEROPTERA: TINGIDAE)

¹Беседина Е.Н., ²Киль В.И., ²Карпунин М.Н.

¹Всероссийский научно-исследовательский институт биологической защиты растений, г. Краснодар, Российская Федерация

²Кубанский государственный университет, г. Краснодар, Российская Федерация

Аннотация. Протестированы 46 RAPD- и 25 ISSR-праймеров на универсальность и специфичность по отношению к ДНК клопов семейства кружевниц (Heteroptera, Tingidae). Выявлены универсальные RAPD-праймеры (OPA 07, 09, 18), обладающие высокой специфичностью и вскрывающие генетический полиморфизм у клопов-кружевниц. Данные праймеры могут быть использованы для внутривидовых и межвидовых сравнений изучаемых клопов.

Ключевые слова. Клопы-кружевницы, RAPD-ПЦР, ISSR-ПЦР, праймер.

UNIVERSAL RAPD AND ISSR PRIMERS FOR LACE BUGS PCR ANALYSIS (HETEROPTERA: TINGIDAE)

¹Besedina E.N., ²Kil V.I., ²Karpunin M.N.

¹All-Russian Scientific Research Institute of Biological Plant Protection, Krasnodar, Russian Federation

²Kuban State University, Krasnodar, Russian Federation

Annotation. 46 RAPD and 25 ISSR primers were tested for universality and specificity for DNA of bugs of the lace family (Heteroptera, Tingidae). Universal RAPD primers (OPA 07, 09, 18), with high specificity and revealing genetic polymorphism in lace bugs were revealed. These primers can be used for intraspecific and interspecific comparisons of the studied bugs.

Key words. Lace bugs, RAPD-PCR, ISSR-PCR, primer.

Изучение генетики популяций вредных насекомых играет большое значение в понимании процессов миграции инвазивных видов и потока генов между популяциями. В этом отношении приоритетными задачами генетики популяций членистоногих являются оценка генетического сходства, разнообразия и полиморфизма.

В литературе имеются данные об изучении молекулярно-генетической структуры китайских и европейских популяций платановой кружевницы с помощью анализа митохондриальных последовательностей ДНК и микросателлитов. Совместное использование этих двух генетических маркеров выявило высокий уровень потока генов между популяциями [1]. Филогенетические исследования семейства Tingidae, включая виды *Corythucha ciliata*, *Corythucha marmorata* и *Stephanitis pyri*, проводились также на основе сравнительного анализа последовательности нуклеотидов участков ядерных и митохондриальных генов (COI, Leu-tRNA, COII, 16S и 28S rRNA) [2-4].

Оценку генетического разнообразия и ДНК-полиморфизма различных видов клопов сегодня традиционно проводят также с помощью различных модификаций метода ПЦР, включая RAPD- и ISSR-PCR [5-6]. Данные молекулярные методы не требуют знания первичной структуры ДНК и в связи с этим просты и доступны. Основная трудность заключается в поиске универсальных и воспроизводимых маркеров, одинаково хорошо иницирующих амплификацию с ДНК всех исследуемых видов насекомых и выявляющих полиморфизм в структуре ДНК. Подобный подход нами применялся при сравнительном анализе ДНК-полиморфизма у насекомых из различных отрядов [7-9].

Целью данного исследования было выявление универсальных и высокоспецифичных относительно ДНК клопов-кружевниц RAPD- и ISSR-праймеров. Задачи исследования включали тестирование стандартного набора праймеров на специфичность и информативность, то есть позволяющих вскрывать полиморфизм ДНК и обладающих при этом высокой степенью специфичности по отношению к ДНК исследуемых видов насекомых.

Материалы и методы. Объектом исследования служили насекомые (n=15, для каждого вида) из г. Краснодара: кружевницы платановой *Corythucha ciliata* Say, дубовой *Corythucha arcuata* Say, грушевой *Stephanitis pyri* F., а также кружевницы тополевой *Monosteira unicastata* Mulsantet Rey из г.

Сочи (Лазаревское), принадлежащих к семейству клопов-кружевниц (Tingidae) отряда полужесткокрылых (Heteroptera). ДНК выделяли из имаго насекомых, электрофорез проводили в 1,8% агарозе. Синтез праймеров осуществлялся фирмой ЗАО «Евроген» (Москва), ДНК-полимераза, буфер и необходимые компоненты для постановки ПЦР - фирмой «Сибэнзим» (Москва).

Результаты и обсуждение. Проведен скрининг набора праймеров для энтомологических исследований (46 RAPD- и 25 ISSR-праймеров) на информативность и специфичность к ДНК клопов-тингид. Как можно заметить из данных, представленных в таблицах 1-2, протестированные нами праймеры обладали разной степенью специфичности к ДНК кружевных клопов.

Таблица 1 – Специфичность RAPD-праймеров к ДНК клопов семейства кружевниц (Heteroptera, Tingidae)

RAPD-праймер	Нуклеотидная последовательность (3'-5')	Степень специфичности праймера
267 / 2	ACATAGACGG	низкая
GT 09	TCTGCCGTGA	низкая
OPA 01	CAGGCCCTTC	средняя
OPA 02	TGCCGAGCTG	высокая
OPA 05	AGGGGTCTTG	средняя
OPA 06	GGTCCCTGAC	низкая
OPA 07	GAAACGGGTG	высокая
OPA 09	GGGTAACGCC	высокая
OPA 10	GTGATCGCAG	средняя
OPA 13	CAGCACCCAC	низкая
OPA 15	TTCCGAACCC	средняя
OPA 18	AGGTGACCGT	высокая
OPA 20	GTTGCGATCC	низкая
OPB 01	GTTTCGCTCC	высокая
OPB 02	TGATCCCTGG	средняя
OPB 04	GGACTIONGAGT	средняя
OPB 07	GGTGACGCAG	низкая
OPB 08	GTCCACACGG	высокая
OPB 10	CTGCTGGGAC	низкая
OPB 18	CCACAGCAGT	низкая
OPC 01	TTCCGAGCCAG	средняя
OPC 02	GTGAGGCGTC	высокая
OPC 03	GGGGGTCTTT	средняя
OPC 04	CCGCATCTAC	низкая
OPC 05	GATGACCGCC	низкая
OPC 08	TGGACCGGTG	низкая
OPC 14	TGCGTGCTTG	низкая
OPD 03	TGGACCGGTG	низкая
OPD 06	ACCTGAACGG	низкая
OPD 09	CTCTGGAGAC	низкая
OPD 12	GAAACGGGTG	низкая
OPE 01	GGTGACTIONGTG	низкая
OPE 07	AGATGCAGCC	высокая
OPN 15	CAGCGACTIONGT	низкая
OPN 19	GTCCGTACTIONTG	низкая
UBC 386	TGTAAGCTCG	низкая
UBC 450	CGGAGAGCCCC	высокая
UBC 489	CGCACGCACA	средняя
UBC 490	AGTCGACCTT	низкая
UBC 519	ACCGGACACT	низкая

UBC 521	CCGCCCCACT	высокая
UBC 531	GCTCACTGTT	низкая
UBC 535	CCACCAACAG	средняя
UBC 538	TGACCTCTCC	низкая
UBC 556	ATGGATGACG	высокая
UBC 580	GCGATAGTCC	низкая

RAPD-праймеры с высокой степенью специфичности генерировали на фореграммах детектируемые ПЦР-фрагменты, при этом отсутствовали пустые треки в электрофорезе (OPA 02). В то же время, праймеры со средней и слабой степенью специфичности не выявили полного спектра фрагментов ДНК у исследуемых образцов клопов (OPD 09) (рисунок 1).

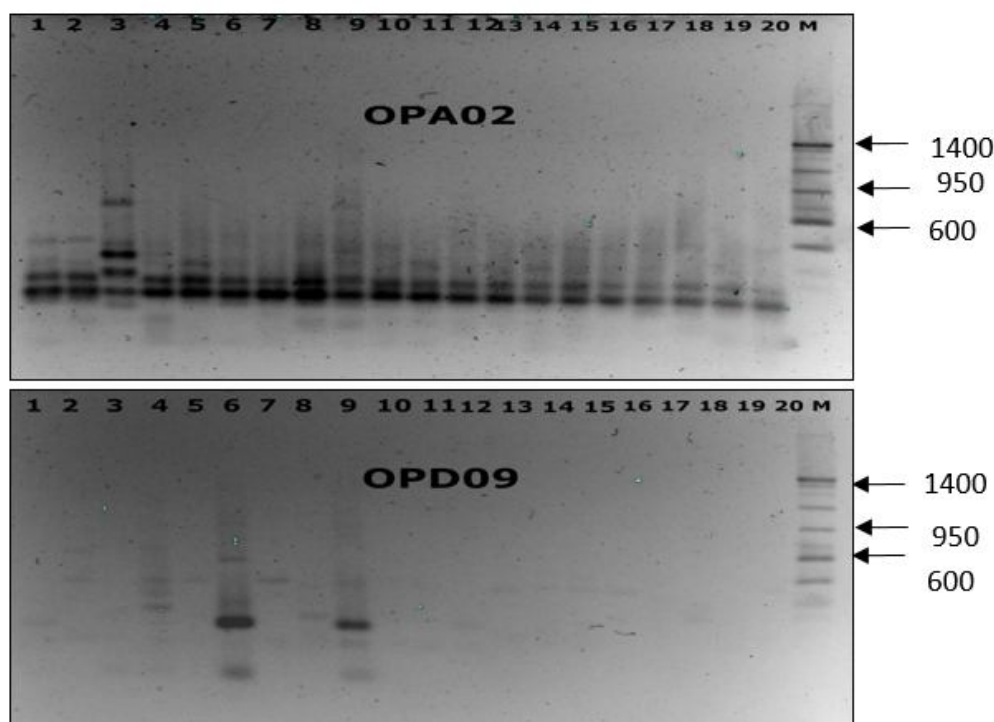


Рисунок 1 – Электрофореграммы продуктов RAPD-PCR в 1,8% агарозе с праймерами OPA 02, OPD 09. Дорожки – ампликоны ДНК различных видов кружевниц, № 1-5 – дубовая (*Corythucha arcuata*); 6-10 – платановая (*Corythucha ciliata*); 11-15 – грушевая (*Stephanitis pyri*); 16-20 – тополевая (*Monosteira unicastata*). М – маркерная ДНК (пар нуклеотидов)

По этой причине нами были выявлены только одиннадцать высокоспецифичных и универсальных RAPD-праймеров для анализа ДНК-полиморфизма клопов-кружевниц: OPA 02, OPA 07, OPA 09, OPA 18, OPB 01, OPB 08, OPC 02, OPE 07, UBC450, UBC521 и UBC556.

Подобным образом, среди ISSR-праймеров мы выявили только пять праймеров с высокой специфичностью к ДНК клопов-кружевниц: INS2, INS3, UBC829, UBC830, UBC880, тогда как остальные протестированные нами ISSR-праймеры обладали низкой специфичностью (табл. 2).

Таблица 2 – Специфичность ISSR-праймеров к ДНК клопов семейства кружевниц (Heteroptera, Tingidae)

ISSR-праймер	Нуклеотидная последовательность (3'-5')	Мотив праймера	Степень специфичности праймера
INS1	AGGAGGAGGAGGAGGAGG	(AGG) ₆	низкая
INS2	CACCACCACCACCACCAC	(CAC) ₆	высокая
INS3	TGGATGGATGGATGGATGGA	(TGGA) ₅	высокая
UBC807	AGAGAGAGAGAGAGAGT	(AG) ₈ T	низкая
UBC808	AGAGAGAGAGAGAGAGC	(AG) ₈ C	низкая
UBC809	AGAGAGAGAGAGAGAGG	(AG) ₉ G	низкая

UBC810	GAGAGAGAGAGAGAGAT	(GA) ₈ T	низкая
UBC811	GAGAGAGAGAGAGAGAC	(GA) ₈ C	низкая
UBC812	GAGAGAGAGAGAGAGAA	(GA) ₈ A	низкая
UBC813	CTCTCTCTCTCTCTT	(CT) ₈ T	низкая
UBC815	CTCTCTCTCTCTCTG	(CT) ₈ G	низкая
UBC816	CACACACACACACAT	(CA) ₈ T	низкая
UBC817	CACACACACACACAA	(CA) ₈ A	низкая
UBC818	CACACACACACACAG	(CA) ₈ G	низкая
UBC822	TCTCTCTCTCTCTCA	(TC) ₈ A	низкая
UBC823	TCTCTCTCTCTCTCC	(TC) ₈ C	низкая
UBC824	TCTCTCTCTCTCTCG	(TC) ₈ G	низкая
UBC826	ACACACACACACACC	(AC) ₈ C	низкая
UBC827	ACACACACACACACG	(AC) ₈ G	низкая
UBC829	TGTGTGTGTGTGTGC	(TG) ₈ C	высокая
UBC830	TGTGTGTGTGTGTGG	(TG) ₈ G	высокая
UBC841	GAGAGAGAGAGAGATC	(GA) ₈ TC	низкая
UBC849	CTCTCTCTCTCTCTTA	(CT) ₈ TA	низкая
UBC864	ATGATGATGATGATGATG	(ATG) ₆	низкая
UBC880	GGAGAGGAGAGGAGA	(GGAGA) ₃	высокая

В то же время, из отобранных нами высокоспецифичных, универсальных RAPD-праймеров в итоге только три (OPA 07, OPA 09, OPA 18) вскрывали полиморфизм ДНК у видов клопов данного семейства.

Таким образом, в ходе скрининга нами выявлены универсальные для клопов-тингид праймеры, которые обладают высокой степенью специфичности, информативности и вскрывают генетический полиморфизм у насекомых этого семейства. Данные праймеры могут быть использованы в дальнейшем для межвидовых сравнений и анализа внутривидовой изменчивости клопов семейства кружевниц.

Список использованных источников

1. W.Y. Yang, X.T. Tang, R.T. Ju, Y. Zhang, Y.Z. Du The population genetic structure of *Corythucha ciliata* (Say) (Hemiptera: Tingidae) provides insights into its distribution and invasiveness // Scientific Reports, 2017, vol. 7, (1):635. DOI: 10.1038/s41598-017-00279-5.
2. A. Kocher, É. Guilbert, É. Lhuillier, J. Muriene Sequencing of the mitochondrial genome of the avocado lace bug *Pseudacysta perseae* (Heteroptera, Tingidae) using a genome skimming approach // Comptes Rendus Biologies, 2015, Vol. 338, Issue 3:149-160. DOI: 10.1016/j.crv.2014.12.004.
3. N.V. Golub, V.B. Golub, V.G. Kuznetsova Further evidence for the variability of the 18S rDNA loci in the family Tingidae (Hemiptera, Heteroptera) // Comparative cytogenetics, 2016, 10(4):517-528. DOI: 10.3897/CompCytogen.v10i4.9631.
4. A. Lin, X. Zhao, X. Li, N. Song The complete mitochondrial genome of *Corythucha marmorata* (Hemiptera: Tingidae) // Mitochondrial DNA Part B, 2017, 2: 897-899. DOI: 10.1080/23802359.2017.1407712.
5. D.R. Sosa-Gomez, J.J. da Silva, F. Costa, E. Binneck, R.R. Silvana, M. and A. L. Nepomuceno Population structure of the Brazilian southern green stink bug, *Nezara viridula* // Journal of Insect Science, 2005, 5(1): 23. DOI: 10.1093/jis/5.1.23.
6. T.D. Gariepy, A. Bruin, T. Haye, P. Milonas, G. Vetek Occurrence and genetic diversity of new populations of *Halyomorpha halys* in Europe // Journal of Pest Science, 2015, 88(3): 451-460. DOI: 10.1007/s10340-015-0672-0.
7. В.И. Киль Использование высокоспецифических RAPD-праймеров для ПЦР-анализа популяций вредных и полезных насекомых // Доклады РАСХН, 2014, 6: 21-25.
8. В.И. Киль, Е.Н. Беседина, И.С. Цыгикало ПЦР-анализ различных видов кокцинеллид (Coleoptera, Coccinellidae) по универсальным RAPD-маркерам // Доклады РАСХН, 2015, 5: 29-33.
9. V.I. Kil Using RAPD PCR method for studying DNA polymorphism of agricultural importance arthropods // Agri Res & Tech: Open Access J., 2017, 9 (4): 555769. DOI: 10.19080/ARTOAJ.2017.09.555769.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и администрации Краснодарского края в рамках научного проекта № 19-44-233009 p_мол_a.