

Мониторинг генетической структуры краснодарской популяции обыкновенной злаковой тли *Schizaphis graminum* Rondani*

Е.Е. Радченко, д.б.н., Т.Л. Кузнецова, к.б.н.,
Н.В. Алпатьева, к.б.н., ВНИИР РАСХН

Обыкновенная злаковая тля *Schizaphis graminum* Rondani — один из наиболее опасных вредителей зерновых культур на юге России. Насекомое зимует на озимых и дикорастущих злаках, весной и в начале лета питается на зерновых колосовых и овсе, а в июне массово мигрирует на сорго. В 2002–2010 гг. анализировали генетическую структуру краснодарской (Кубанская опытная станция ВИР — КОС ВИР, Гулькевичский р-н) популяции тли. Выявили высокий полиморфизм насекомого по вирулентности к образцам сорго и ячменя с разными генами устойчивости, а также по RAPD маркерам — как общий, так и сезонный. Важную роль в сезонной вариации частот фенотипов вирулентности играют абиотические факторы, под воздействием которых может меняться относительная конкурентоспособность клонов тли, и, следовательно, изменение условий среды приводит к дифференциальному отбору в популяции *S. graminum*. Наблюдали отбор из популяции генотипов насекомых, специфически приспособленных к виду растения-хозяина. Так, на ячмене преобладали авирулентные к устойчивым образцам сорго клоны. Миграция тли с ячменя на сорго приводила к быстрому накоплению клонов, вирулентных к генам устойчивости сорго Sgr1–Sgr4 и Sgr12 [1, 2].

Материал и методы. В 2012 г. анализировали структуру краснодарской (КОС ВИР) популяции *S. graminum* по вирулентности к образцам сорго и ячменя. Насекомых собирали в июле и августе на посевах восприимчивого образца к-10007 СЛВ-2. В лаборатории две собранные субпопуляции клонировали (июль — 22 клона, август — 61) и оценили поврежденность образцов сорго сорта Сарваши (гены устойчивости Sgr1 + Sgr2), Shallu (Sgr3), Deer (Sgr4), Соргоградское (Sgr5), Дурра белая (Sgr5 + Sgr6), Сарбам (Sgr12) [3, 4]. Всходы заселяли тлями одного клона и при гибели контроля (Низкорослое 81) определяли поврежденность по шкале от 0 до 10 (гибель растений). Полиморфизм субпопуляций оценивали по частотам фенотипов, которые идентифицировали с помощью упомянутых образцов, разделённых на две группы: Deer — Сарваши — Сарбам и Shallu — Соргоградское — Дурра белая. В каждой группе в случае авирулентности клона тли образцу присваивали значение 0. В случае вирулентности (восприимчивости сорго) первому образцу присваивали значение 1, второму — 2, третьему — 4. Фенотип

вирулентности клона тли обозначали числом из двух цифр, каждая из которых являлась суммой реакций дифференциаторов. Для оценки изменчивости и сравнения субпопуляций тли пользовались критериями Животовского [5].

Изучили изменчивость 49 клонов тли, собранных в августе на сорго, по вирулентности к образцам ячменя, т.е. культуры, которая в июне уже созревает и не является хозяином фитофага в период сбора субпопуляций. Оценивали поврежденность устойчивых к ряду идентифицированных в США биотипов насекомого сортов Post, Wintermalt и Herb, а также выделенных нами образцов к-16190, к-15600 из Китая и к-28129 из КНДР [6]. Использовали такой же подход, как и при работе с сорго. Образцы распределили в две группы в следующем порядке: Post — Herb — Wintermalt и к-16190–28129–15600.

С целью изучения закономерностей отбора фитофагов по вирулентности под влиянием генотипов растений сравнили изменение частот четырёх фенотипов вирулентности фитофага (00, 51, 73, 77) в искусственных популяциях, сформировавшихся после длительного размножения тли на образцах сорго Низкорослое 81 (неустойчивый контроль), Shallu (имеет ген устойчивости Sgr3) и Дурра белая (Sgr5 + Sgr6). В краснодарской популяции частота фенотипа 73 высока, остальные встречаются намного реже. Опытные образцы выращивали в оранжерее под изоляторами до фазы кушения, заселяли одновозрастными тлями с разными фенотипами вирулентности в соотношении 1:1:1:1 и через 2 месяца рендомизированно отбирали самок. После размножения отобранных клонов оценивали устойчивость к ним упомянутых выше шести образцов-дифференциаторов. Вследствие высокой смертности тлей на образце сорго сорта Дурра белая удалось изучить лишь 6 клонов насекомого.

Кроме того, оценили изменчивость насекомого с помощью пиросеквенирования фрагментов митохондриального генома. В ходе исследования изучили нуклеотидный полиморфизм трёх фрагментов общей протяжённостью 422 пары нуклеотидов (пн). Эти последовательности ранее были использованы F.O. Aikhionbare, Z.B. Mayo [7] для идентификации распространённых в США биотипов *S. graminum* B, C, E–I.

ДНК выделяли из колоний тли, собранных в 65 точках на посевах восприимчивого образца сорго СЛВ-2 по методике, предложенной на сайте molbiol (http://molbiol.ru/protocol/14_04.html) с рядом модификаций. По аналогии с праймерами, предложенными F.O. Aikhionbare,

* При поддержке РФФИ (грант № 12-04-00710)

Z.B. Mayo [7], разработали праймеры для амплификации трёх областей митохондриального генома: F GGTCTTTTCGTAATTGAATATAACCC и R GAGTTCAAACCGGCGTAAGCCAGGT для идентификации фрагмента гена ND1, межгенного спейсера, tRNA-Leu и фрагмента 16S rRNA длиной 156 пн; F ACTTGAATCGGAATACAGCCAGT и R GGATTTTTTACCACGATTTTCGTTAGAT для фрагмента гена cytochrome b, tRNA-Ser и фрагмента ND1 длиной 174 пн; F GAGGGAGGAAAAGATATATTTG и R GCTTATTCATCTGTTGTTCA – для фрагмента гена ND4 длиной 92 пн. Пиросеквенирование проводили на приборе GS Junior от Roche/454 в ЦКП «Геномные технологии и клеточная биология» (ВНИИСХМ РАСХН). Выравнивание нуклеотидных последовательностей и их анализ проводили с помощью программы MEGA.

Результаты и обсуждение. Повреждённость образцов сорго сорта Дурра белая и Деер авирулентными клонами не превышала 2 баллов. Широкое варьирование характерно для сортов Сарваши, Сарбам (1–4 балла) и Соргоградское (2–4 балла); повреждённость Shallu авирулентными клонами составляла преимущественно 3 балла. Вирулентные клоны во всех случаях обуславливали повреждённость растений 9–10 баллов.

Частоты вирулентных к изучаемым образцам клонов тли существенно различались. Если сорго сорта Сарваши сильно повреждали 77 клонов из 83 изученных, то лишь 12 клонов были вирулентны к образцу сорта Дурра белая. Выявили 18 фенотипов вирулентности (9 – июль, 16 – август), при этом доминировал фенотип 71 (частота в июле – 0,26, в августе – 0,24). Наблюдали отчётливое снижение частот вирулентности к образцам Дурра белая (18,1% в июле и 13,1% в августе) и Деер (81,8–63,9%), а также повышение – для сорта Shallu (59,0–86,9%).

Выявили 14 фенотипов вирулентности тли, питавшейся на ячмене. Доминировал (26,5%) вирулентный к сортам селекции США фенотип 70. Наиболее высоки частоты клонов, сильно повреждающие сорта Herb (89,8%) и Wintermalt (93,9%). В большинстве случаев наблюдали слабо выражен-

ную устойчивость (7–8 баллов) против вирулентных клонов, что, очевидно, обуславливается проявлением генов со слабым фенотипическим эффектом.

Наиболее конкурентоспособным оказался клон с фенотипом вирулентности 73 (табл. 1). На образце сорта сорго Дурра белая не имеющие генов вирулентности к дифференциаторам насекомые погибли, а частота клонов, вирулентных к одному из генов устойчивости этого образца (*Sgr5*), оказалась выше, чем вирулентных к двум генам (фенотип 77). Очень редко встречающийся в природе фенотип 51, несмотря на вирулентность к сорту Shallu, был менее конкурентоспособен на этом образце, чем клон с фенотипом вирулентности 00.

Сравнили плодовитость на сорте пшеницы Ленинградская 97 самок с фенотипами вирулентности 77 и 73, длительно питавшихся на образцах сорго, с исходными клонами. Оказалось, что после питания на сорго плодовитость самок с фенотипом вирулентности 77 возросла в 1,5 раза ($P < 0,01$), однако для второго фенотипа различия были незначительны. Возможность изменения неспецифической агрессивности клонов следует изучить на более обширном материале.

В ходе анализа краснодарской популяции получили 139 воспроизводимых последовательностей (табл. 2). Полиморфные сайты обнаружены во всех фрагментах, за исключением спейсера между геном ND1 и tRNA-Leu, который оказался идентичен во всех последовательностях. Преобладали (около 80%) идентичные варианты последовательностей фрагментов ND1, межгенного спейсера, tRNA-Leu, cytochrome b, tRNA-Ser. Вместе с тем обнаружено несколько последовательностей, которые отличаются от доминирующих фрагментов одной или двумя нуклеотидными заменами. Полученные данные согласуются с результатами F.O. Aikhionbare, Z.B. Mayo [7], которые характеризуют эти фрагменты как низко- и среднеполиморфные.

Наиболее полиморфным оказался фрагмент гена ND4. Обнаружено 3 типа последовательностей, обозначенных нами I, II и III (рис.), встречаемость которых составила 40, 42 и 18% соответственно.

1. Характеристика по вирулентности модельных популяций *S. graminum*, сформировавшихся на образцах сорго

Образец, на котором сформирована популяция	Изучено клонов тли	Частота фенотипа вирулентности, %				Среднее число фенотипов
		00	51	73	77	
Низкорослое 81	34	26,5	17,6	35,3	20,6	3,93 ± 0,09
Shallu	36	22,2	5,6	50,0	22,2	3,56 ± 0,21
Дурра белая	6	0	16,7	50,0	33,3	2,87 ± 0,25

2. Характеристика изученных фрагментов митохондриального генома *S. graminum*

Фрагмент	Изучено фрагментов	Число полиморфных сайтов
ND1, межгенный спейсер, tRNA-Leu	74	11
Cytochrome b, tRNA-Ser, ND1	23	5
ND4	42	20

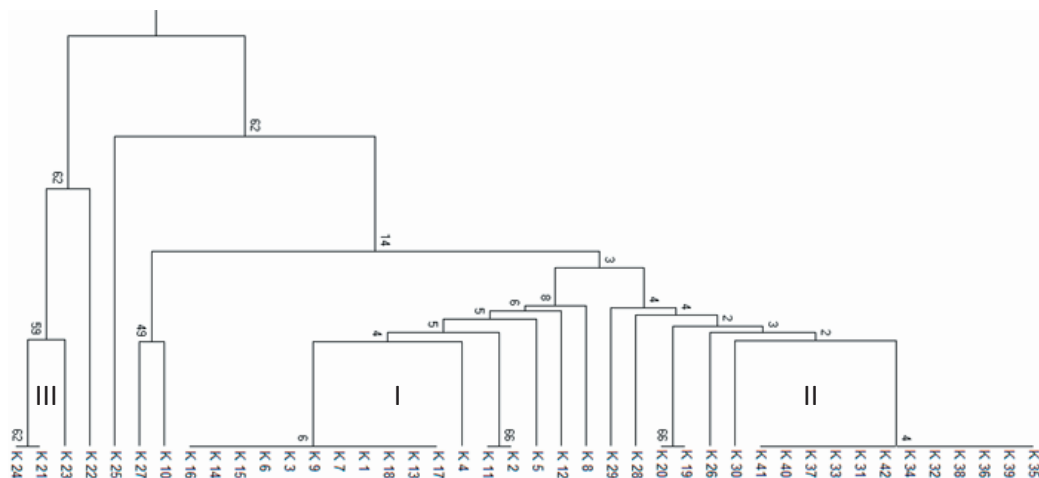


Рис. – Дендрограмма степени сходства нуклеотидных последовательностей фрагмента гена ND4 *S. graminum*. Римскими цифрами I, II и III обозначены основные митотипы

Основной вклад в дифференциацию митотипов вносит строение триплета, кодирующего 323-ю аминокислоту лейцин (Leu) в предполагаемой белковой последовательности фермента: для митотипа I – TTG, для II – CTG и для III – TTA. Кроме того, митотип III отличается от двух других строением триплета, кодирующего 299 аминокислоту Gly (GGG – для I и II митотипов и GGT – для III). Отметим, что редкие для российских популяций варианты, характерные для митотипа III, распространены в США и обнаруживаются у биотипов *S. graminum* B, C, E–I.

Вывод. Таким образом, выявлена высокая общая и сезонная вариабельность обыкновенной злаковой тли по вирулентности к образцам сорго и ячменя с различными генами устойчивости. Генетическая структура популяции насекомого может радикально меняться в период вегетации хозяина. Показана необходимость многократных сборов *S. graminum* в течение одного сезона вегетации злаков для корректного изучения структуры популяций фитофага и для идентификации генов устойчивости растений-хозяев. Установлена возможность изменения неспецифической агрессивности клонов

тли под влиянием генотипов растений. Впервые с помощью пиросеквенирования показана неоднородность краснодарской популяции *S. graminum* по нуклеотидным последовательностям фрагментов митохондриального генома.

Литература

1. Радченко Е.Е., Кузнецова Т.Л., Алпатьева Н.В. Динамика генетической структуры краснодарской популяции обыкновенной злаковой тли при смене растения-хозяина // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2012. Т. 16. № 2. С. 480–487.
2. Радченко Е.Е., Кузнецова Т.Л., Зубов А.А. Многолетний сезонный полиморфизм краснодарской популяции обыкновенной злаковой тли по вирулентности к образцам сорго с различными генами устойчивости // Экология. 2012. Т. 43. № 3. С. 182–187.
3. Радченко Е.Е. Идентификация генов устойчивости сорго к обыкновенной злаковой тле // Генетика. 2000. № 4. Т. 36. С. 510–519.
4. Радченко Е.Е. Наследование устойчивости образцов зернового сорго и суданской травы к обыкновенной злаковой тле // Генетика. 2006. № 1. Т. 42. С. 65–70.
5. Животовский Л.А. Показатели популяционной изменчивости по полиморфным признакам // Фенетика популяций. М.: Наука, 1982. С. 38–44.
6. Радченко Е.Е., Звейнек И.А., Тырышкин Л.Г., Коновалова Г.С. и др. Ячмень. Устойчивость образцов из Юго-Восточной Азии к вредителям и болезням // Каталог мировой коллекции ВИР. Вып. 751. СПб.: ВИР, 2004. 43 с.
7. Aikhionbare F.O., Mayo Z.B. Mitochondrial DNA sequences of greenbug (Homoptera: Aphididae) biotypes // Genetic Analysis Biomol. Engineering. 2000. V. 16. № 6. P. 199–205.