

# ЗАЩИТА РАСТЕНИЙ

## СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ НЕКОТОРЫХ ВИДОВ ТРИПСОВ НА ОСНОВЕ PCR-RFLP И ПРЯМОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ

Е.С. Мазурин<sup>1,2</sup>, В.Г. Заец<sup>1</sup>,  
Н.А. Шероколава<sup>2</sup>, Н.И. Ершова<sup>2</sup>

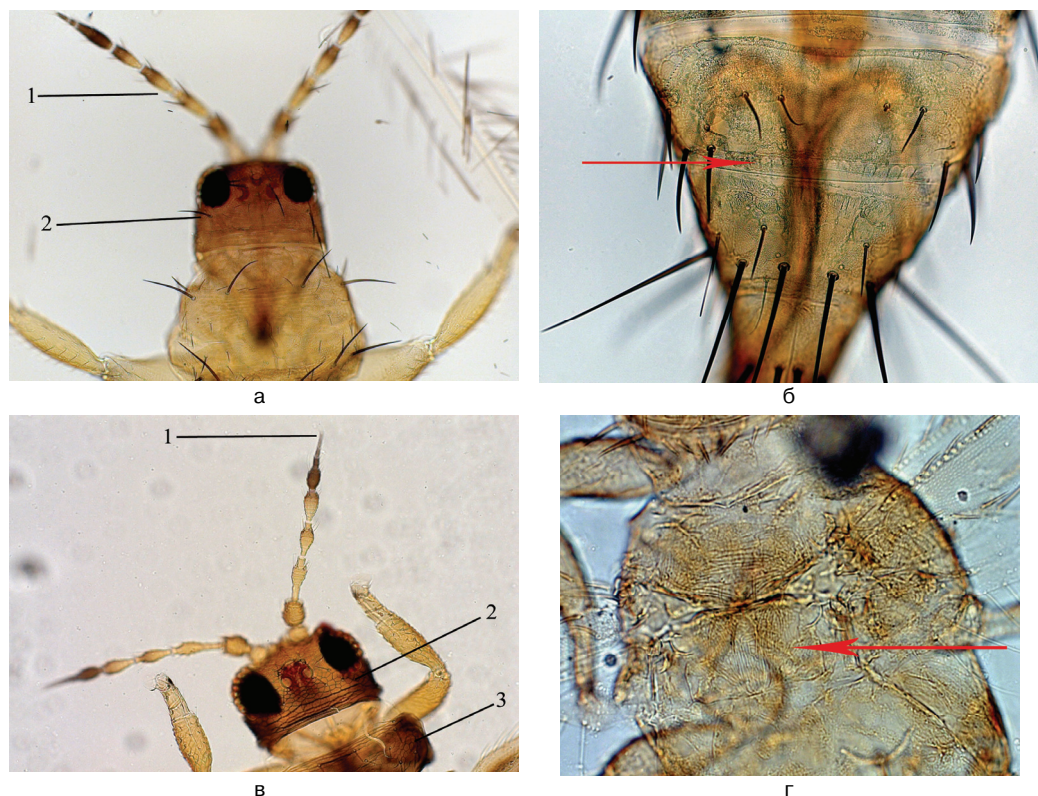
<sup>1</sup>Кафедра ботаники, физиологии, патологии растений и агробиотехнологии  
Российский университет дружбы народов  
ул. Миклухо-Маклая, 8/2, Москва, Россия, 117198

<sup>2</sup>ФГУ «Всероссийский центр карантина растений»  
ул. Пограничная, 32, пос. Быково, Раменский р-н,  
Московская обл., Россия, 140150

В работе изложены особенности диагностики основных видов трипсов, встречающихся в фитосанитарной экспертизе. Проведено сравнение морфологических методов диагностики с PCR-RFLP и прямым секвенированием. Показана высокая достоверность молекулярно-генетических методов, которые позволяют устанавливать видовую принадлежность личинок трипсов, а также поврежденных имаго.

**Ключевые слова:** трипс, признак, ПЦР, диагностика, праймеры, видовая принадлежность, RFLP, фитосанитарная экспертиза.

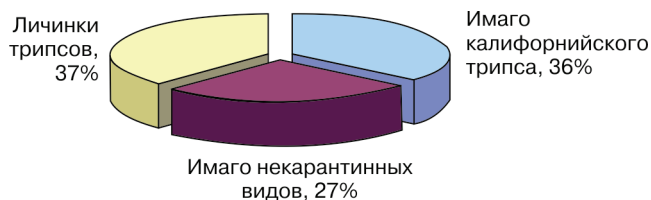
Видовая диагностика трипсов является важной задачей карантинной фитосанитарной экспертизы. В первую очередь это связано с риском ввоза отсутствующих видов и распространения уже существующих. В списке карантинных вредных организмов включено 2 вида трипсов. Из них ограниченно распространен калифорнийский трипс *Frankliniella occidentalis* (Perg.). К отсутствующим видам относится трипс Пальмы *Thrips palmi* Karny. Несмотря на то что существует достаточно признаков морфологического определения имаго трипсов (рис. 1), остается открытым вопрос видовой принадлежности личинок, особенно младших возрастов. Это объясняется отсутствием четко разграниченных морфологических признаков личинок. Метод дорастивания личинок значительно ограничен в связи со сжатыми сроками фитосанитарной экспертизы и длительным периодом, необходимым для достижения имагинальной стадии. Лишь в этом случае становится возможной диагностика по четким морфологическим признакам, некоторые из которых представлены на рис. 1.



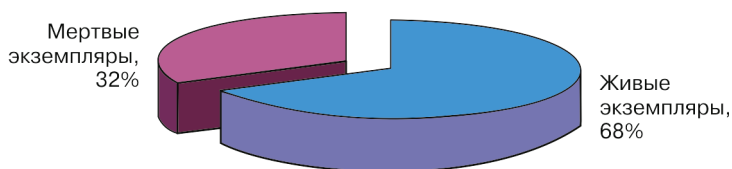
**Рис. 1.** Наиболее характерные отличительные признаки основных видов трипсов, встречающихся в подкарантинной продукции:  
 а) *F. occidentalis*: 1 — 8-члениковый усик, 2 — одна заглазная щетинка; б) *F. occidentalis*: характерный гребешок на брюшке; в) *H. femoralis*: 1 — хлыстовидный 8-й членик усика, 2 и 3 — сетчатость головы и переднеспинки; г) *T. tabaci*: сетчатая структура среднегруды

Из некарантинных видов наибольшее распространение имеет табачный трипс *Thrips tabaci* Lindemann, трипс декоративный *Hercinothrips femoralis* (Reuter).

Показано (рис. 2), что 37% от общего числа диагностируемых видов трипсов представлены личинками разных возрастов, которые не могут быть достоверно определены до вида. Также видно (рис. 3), что 32% выявленных трипсов составляют мертвые имаго, иногда в виде фрагментов с утратой диагностических признаков, что не позволяет идентифицировать вид. В связи с этим необходимы достоверные методы диагностики трипсов в личиночной стадии, а также в случаях невозможности определения мертвых имаго.



**Рис. 2.** Соотношение диагностируемых видов трипсов, выявленных при проведении фитосанитарной экспертизы в ФГУ «ВНИИКР» в 2008 г.



**Рис. 3.** Соотношение живых и мертвых экзemplяров имаго трипсов при фитосанитарной экспертизе в ФГУ «ВНИИКР» в 2008 г.

К современным направлениям диагностики насекомых относится использование полимеразной цепной реакции (ПЦР) в различных ее модификациях. Этот метод диагностики позволяет определять видовую принадлежность насекомого на любой стадии его развития. Важным преимуществом данного метода является также возможность диагностики при повреждении имаго или даже при наличии только небольших его фрагментов. Кроме того, перспективным направлением является использование ПЦР для диагностики трипса на стадии яйца.

Поэтому задачей нашей работы являлась оценка возможности достоверного определения личинок трипса и поврежденных имаго с помощью известных молекулярно-генетических методов на основе PCR-RFLP (restriction fragment length polymorphism, полиморфизм длин рестрикционных фрагментов, ПДРФ) и прямого секвенирования.

**Материалы и методы.** В работе использовали фиксированный спиртовой материал имаго и личинок трипса, а также живых насекомых, обнаруженных в ходе экспертизы подкарантинного материала. ДНК насекомых выделяли, измельчая одну особь трипса в 100 мкл буфера [3]: 100 мМ Tris-HCl pH 8,0; 100 мМ ЭДТА pH 8,0; 1% SDS, 0,1 мг/мл протеиназы К. Инкубировали 20 мин. при 65 °С. К полученному лизату добавляли смесь фенола и хлороформа с изоамиловым спиртом (24 : 1). ДНК осаждали изопропанолом с дополнительной промывкой 70% этанолом. Выделенную ДНК растворяли в ТЕ-буфере и хранили при -20 °С.

Для выделения ДНК из образцов, хранившихся под спиртом в течение длительного времени, был использован набор для выделения ДНК из тканей животных серии «ДНК-Экстран» (ЗАО «Синтол», Москва). Метод основан на обработке тканей образца протеиназой К с последующим удалением белков без экстракции органическими растворителями. Осаждение ДНК из очищенного раствора проводили изопропиловым спиртом с использованием гликогена в качестве соосадителя, что значительно увеличивает конечный выход ДНК.

Диагностику трипса по морфологическим признакам проводили с использованием жидкости Фора-Берлезе, основным компонентом которой является хлоралгидрат. Использование ДНК-диагностики после приготовления микропрепарата невозможно, т.к. хлорсодержащие вещества разрушают ДНК и сильно ингибируют ПЦР. Поэтому для сравнения морфологического и молекулярно-генетического методов диагностики одну особь трипса разрезали на две части. Из одной половины готовили микропрепарат с диагностическими признаками, позволяющи-

ми определить вид трипса. Из другой части выделяли ДНК, которую использовали для постановки ПЦР.

Личинок трипса отбирали из популяции, в которых присутствовали взрослые особи, что позволяло предположить их видовую принадлежность.

В качестве специфической мишени в геноме трипса был взят митохондриальный ген цитохромоксидазы субъединицы I (COI) [2; 4; 5]. Для амплификации использовали универсальные праймеры [1] mtD-7.2F 5'-att-agg-agc-hcc-hga-yat-agc-att-3' и mtD-9.2R 5'-cag-gca-aga-tta-aaa-tat-aaa-ctt-ctg-3', которые амплифицируют продукт размером 433 п.о. (пары оснований).

Полученный продукт ПЦР очищали с использованием набора Fermentas (#K0701) «GeneJET PCR». Далее проводили рестрикционный анализ [1] с использованием эндонуклеаз рестрикции AluI и Kzo9I (изошизомер Sau3AI) производства ООО «Сибэнзим-М» (Новосибирск) или проводили прямое секвенирование. Интерпретация результатов проводилась после электрофореза по набору длин фрагментов для каждой из эндонуклеаз. При обработке продукта ПЦР с праймерами mtD-7.2F/mtD-9.2R эндонуклеазой AluI [1] оказался характерен набор фрагментов, п.о.: для *F. occidentalis* — 218+135+93+39, для *H. femoralis* — 218+141+126, для *T. tabaci* — 350+135. При использовании эндонуклеазы Kzo9I характерен набор фрагментов, п.о.: для *F. occidentalis* — 252+104+88+41, для *H. femoralis* — 293+88+77+27, для *T. tabaci* — 293+192.

Для секвенирования использовали праймеры mtD-7.2F и mtD-9.2R в случаях свежего спиртового материала.

В некоторых случаях было необходимо использовать праймеры, рекомендованные для каждого из видов трипсов. Для *F. occidentalis* — праймеры FrF 5'-ctt-ctt-cca-ccc-tct-tta-aca-3' и FrR 5'-act-gat-caa-aca-aat-aaa-gtt-atc-t-3', размер продукта 248 п.о., для *H. femoralis* — Hf 5'-ggt-ata-ttt-gga-gaa-ggt-gct-g-3' и Hr 5'-tgc-tcc-agc-tag-aac-tgg-taa-3', размер продукта 267 п.о. В этом случае ставили nested PCR, т.е. после амплификации с праймерами mtD-7.2F и mtD-9.2R продукт разводили в 100 раз в автоклавированной дистиллированной воде и ставили ПЦР с праймерами FrF/FrR и Hf/Hr. Далее с ними же проводили секвенирование. Последовательности после секвенирования выравнивали при помощи программы BioEdit. Выровненные последовательности оценивали в приложении BLAST NCBI.

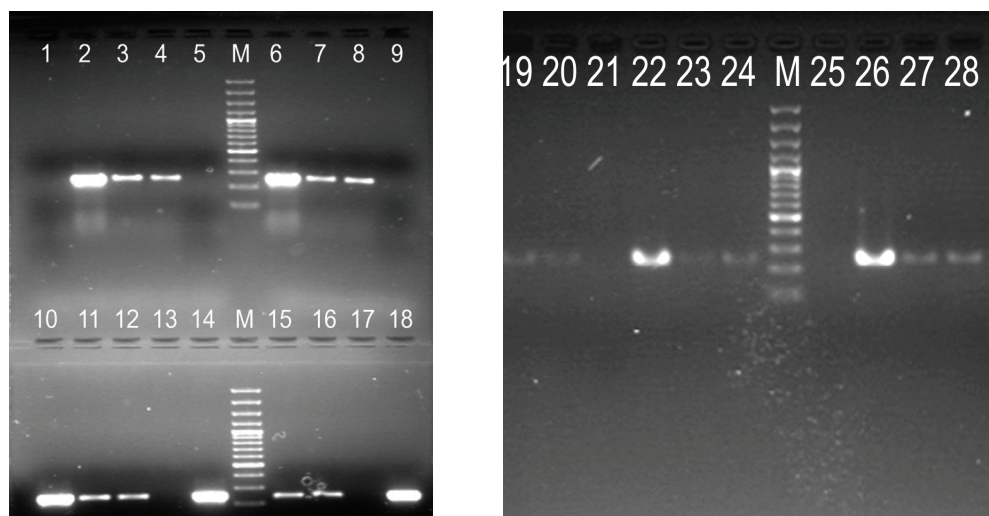
Реакционная смесь одной ПЦР реакции объемом 40 мкл содержала: 1х ПЦР буфер (Диалат, Москва), 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 мкМ каждого из dNTP, 25 пкМ каждого из праймеров, 2 ед. «hot-start» SmarTag полимеразы (Диалат, Москва). Температурно-временные параметры амплификации для праймеров mtD-7.2F/mtD-9.2R включали преденатурацию — 5 мин. при 95 °С, далее 35 циклов, состоявших из: 1 мин. при 95 °С, 1 мин. при 56 °С, 1 мин. при 72 °С; финальный досинтез — 10 мин. при 72 °С; хранение при +40 °С. Для праймеров FrF/FrR и Hf/Hr программа амплификации включала: 5 мин. при 95 °С, далее 30 циклов, состоявших из: 15 сек. при 95 °С, 30 сек. при 55 °С, 30 сек. при 72 °С; финальный досинтез — 10 мин. при 72 °С; хранение при +40 °С. ПЦР с оптимизацией темпе-

ратуры отжига праймеров проводили на амплификаторе Eppendorf Gradient. Результаты регистрировали после проведения электрофореза в 1,5%-м агарозном геле, окрашенном бромистым этидием в гель-документирующей системе Quatum-ST-4-1500 (Япония). Размер продукта ПЦР измеряли, используя маркеры молекулярного веса GeneRuler™ 100+ п.н. (пара нуклеотидов) и Fast Ruler™ (Fermentas).

Постановку рестрикционного анализа проводили, используя инструкцию производителя (СибЭнзим). Разделение продуктов после рестрикции проводили в 2%-м агарозном геле в течение 3 часов при напряженности 5В на 1 см геля.

**Результаты и обсуждение.** Проведение ПЦР с парой праймеров mtD-7.2F/mtD-9.2R во всех исследуемых образцах показало наличие полосы размером 433 п.н. Однако не во всех случаях этот продукт был пригоден для дальнейшего секвенирования даже при постановке ПЦР в градиенте температур отжига праймеров. Особенно это относилось к образцам, которые длительное время находились в спирте.

В работе оценивалась специфичность праймеров FrF/FrR и Hf/Hr, т.е. возможность определить видовую принадлежность трипсов (рис. 4 и 5). Но оказалось, что зачастую можно было наблюдать перекрестную неспецифичную реакцию. Так, праймеры FrF/FrR, сконструированные для *F. occidentalis*, давали заметные фрагменты того же размера с *H. femoralis* (рис. 4). При этом повышение температуры отжига праймеров не сильно влияло на специфичность реакции, а при температуре выше 56 °С наблюдалось снижение эффективности ПЦР с целевым объектом.

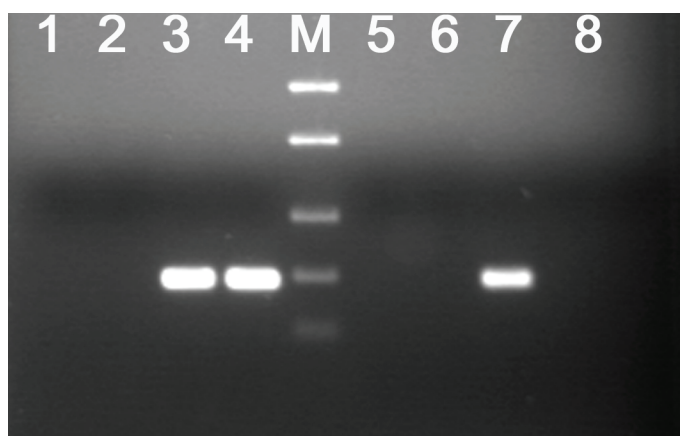


**Рис. 4.** Электрофореграмма продуктов амплификации с праймерами FrF/FrR с ДНК:

*F. occidentalis* — 2, 6, 10, 14, 18, 22, 26; вода — 1, 5, 9, 13, 17, 21, 25;  
*H. femoralis* — 3, 4, 7, 8, 11, 12, 15, 16, 19, 20, 23, 24, 27, 28 при различной температуре отжига: 1—4 — 50 °С, 5—8 — 51,8 °С, 9—12 — 52,9 °С, 13—16 — 54 °С, 17—20 — 55,1 °С, 21—24 — 56,4 °С, 25—28 — 58,2 °С; М — маркер GeneRuler™

Использование дополнительных праймеров FrF/FrR и Hf/Hr позволило значительно повысить специфичность ПЦР и провести дальнейшее секвенирование с более высокой точностью.

Похожую картину можно было наблюдать с праймерами Hf/Hr, сконструированными для *H. femoralis* (рис. 5). Специфичность их сильно зависела от начальной концентрации матричной ДНК. Перекрестная реакция с *F. occidentalis* наблюдалась при внесении в реакционную смесь 20 нг ДНК этого трипса. Концентрация ДНК сильно варьирует в зависимости от состояния, способа и длительности хранения насекомых. По этой причине праймеры FrF/FrR и Hf/Hr не могут быть использованы для видоспецифичной диагностики. Эти праймеры могут быть использованы в nested PCR после амплификации с праймерами mtD-7.2F/mtd-9.2R, что позволяет значительно повысить качество подготовки матрицы для дальнейшего секвенирования.

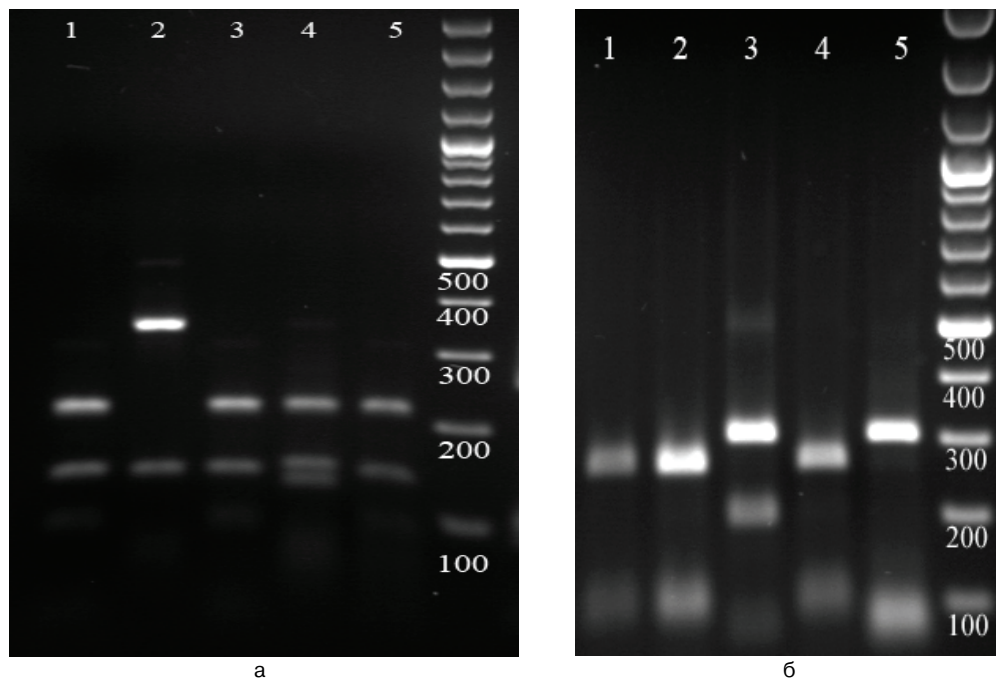


**Рис. 5.** Электрофореграмма продуктов амплификации с праймерами Hf/Hr с ДНК:

*F. occidentalis* — 2 нг, дорожки 1, 2; 10 нг, дорожки 5, 6; 20 нг, дорожка 7;  
*H. femoralis* — дорожки 3, 4; вода — дорожка 8; M — маркер Fast Ruler™

Результаты PCR-RFLP представлены на рис. 6. Как следует из электрофореграммы, каждому виду трипса соответствует набор бэндов определенного размера. Важно отметить, что использование положительного контроля (заведомо известного вида трипса) в этом случае значительно упрощает задачу диагностики. После проведения электрофореза необходимо сопоставить длины полос исследуемого образца с известным видом. Если такого контроля нет, то обязательно использование качественного ДНК-маркера молекулярного веса.

В табл. приведены сравнительные результаты диагностики различных видов трипсов различными способами. Молекулярные методы диагностики точно соответствовали результатам морфологических методов. При этом использование диагностики трипса, основанной только на морфологии насекомого, не позволяло определить его на всех стадиях развития.



**Рис. 6.** Результаты ПДРФ ПЦР продукта с праймерами mtD-7.2F/mtD-9.2R:

а) с рестриктазой AluI: 1, 3, 5 — *F. occidentalis*; 2 — *T. tabaci*; 4 — *H. femoralis*;  
 с рестриктазой Kzo9I: 1, 2, 4 — *F. occidentalis*; 3 — *T. tabaci*; 5 — *H. femoralis*  
 (500, 400... — количество пар оснований)

Таблица

**Сравнительная характеристика различных методов диагностики трипсов**

Диагностируемый материал	Кол-во, шт.	Диагностика по морф. признакам	PCR-RFLP (Brunner et al., 2002)	Прямое секвенирование ген COI
Имаго <i>F. occidentalis</i> , спиртовой материал	18	<i>F. occidentalis</i>	<i>F. occidentalis</i>	<i>F. occidentalis</i>
Личинки из популяции <i>F. occidentalis</i> , спиртовой материал	9	не определены	<i>F. occidentalis</i>	<i>F. occidentalis</i>
Имаго <i>F. occidentalis</i> , живой материал	10	<i>F. occidentalis</i>	<i>F. occidentalis</i>	<i>F. occidentalis</i>
Личинки из популяции <i>F. occidentalis</i> , живой материал	6	не определены	<i>F. occidentalis</i>	<i>F. occidentalis</i>
Имаго <i>F. occidentalis</i> , мертвые, материал экспертизы	10	3 шт. не определены, остальные — <i>F. occidentalis</i>	<i>F. occidentalis</i>	<i>F. occidentalis</i>
Имаго <i>H. femoralis</i> , хранение в спирте 6—12 мес.	5	<i>H. femoralis</i>	<i>H. femoralis</i>	<i>H. femoralis</i>
Личинки из популяции <i>H. femoralis</i> , живой материал	4	не определены	<i>H. femoralis</i>	<i>H. femoralis</i>
Имаго <i>T. tabaci</i> , живой материал	5	<i>T. tabaci</i>	<i>T. tabaci</i>	<i>T. tabaci</i>
Личинки из популяции <i>T. tabaci</i> , живой материал	5	не определены	<i>T. tabaci</i>	<i>T. tabaci</i>

Использование методов PCR-RFLP и прямого секвенирования позволило значительно повысить достоверность диагностики за счет точного видового определения мертвых экземпляров трипса как имаго, так и на стадии личинки. Использование молекулярно-генетических методов должно дополнять диагностику по мор-

фологическим признакам, особенно в случаях наличия в анализируемом материале личинок и поврежденных имаго.

**Выводы.** Результаты диагностики методами секвенирования и постановки PCR-RFLP показали высокую степень соответствия в сравнении с морфологическим методом. При установлении фитосанитарного состояния подкарантинной продукции рекомендуется дополнять морфологический анализ использованием молекулярно-генетических методов, что позволит более точно идентифицировать карантинные виды и препятствовать проникновению их на территорию РФ.

#### ЛИТЕРАТУРА

- [1] Brunner P.C., Fleming C., Frey J.E. A molecular identification key for economically important thrips species (Thysanoptera: Thripidae) using direct sequencing and a PCR-RFLP-based approach // *Agricultural and Forest Entomology*. — 2002. — V. 4. — P. 127—136.
- [2] Simon C., Frati F., Beckenbach A., Crespi B., Liu H., Flook P. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers // *Annals of the Entomological Society of America*. — 1994. — V. 87. — P. 651—701.
- [3] Toda S., Komazaki S. Identification of thrips species (Thysanoptera: Thripidae) on Japanese fruit trees by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism of the ribosomal ITS2 region // *Bull. Entomol. Res.* — 2002. — V. 92. — P. 359—363.
- [4] Toda S., Murai T. Phylogenetic analysis based on mitochondrial COI gene sequences in *Thrips tabaci* Lindeman (Thysanoptera: Thripidae) in relation to reproductive forms and geographic distribution // *Appl. Entomol. Zool.* — 2007. — V. 42. — № 2. — P. 309—316.
- [5] Toshiro Inoue, Tamito Sakurai. The phylogeny of thrips (Thysanoptera: Thripidae) based on partial sequences of cytochrome oxidase I, 28S ribosomal DNA and elongation factor-1a and the association with vector competence of tospoviruses // *Appl. Entomol. Zool.* — 2007. — V. 42. — № 1. — P.71—81.

### UP-TO-DATE DIAGNOSTIC METHODS FOR SOME THRIPS SPP BASED ON PCR-RFLP AND DIRECT SEQUENCING

E.S. Mazurin<sup>1,2</sup>, V.G. Zaets<sup>1</sup>,  
N.A. Sherokolava<sup>2</sup>, N.I. Ershova<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of botany, plant physiology, plant pathology and agrobiotechnology  
Russian People's Friendship University  
*Miklucho-Maklay str., 8/2, Moscow, Russia, 117198*

<sup>2</sup>All-Russian Plant Quarantine Center  
*Pogranichnaya, 32, Bykovo, Ramenskoe,  
Moscow region, 140150, Russia*

The study reveals diagnosis peculiarities for main Thrips spp. occurring during phytosanitary testing. Morphological diagnostic methods were compared with PCR-RFLP and direct sequencing. High reliability of molecular and genetic methods has been shown. These methods provide for determining the species of thrips larvae and damaged specimens of imagoes.

**Key words:** thrips, PCR, diagnostics, parameters, accessory of species, RFLP, phytosanitary expertise.