

УДК 632.78:577.21

ПОИСК RAPD-МАРКЕРОВ ДЛЯ ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ ПОПУЛЯЦИЙ ЭНТОМОФАГА *HABROBRACON HEBETOR* SAY

Беседина Е.Н., Настасий А.С.

350039, г. Краснодар, п/о 39

ФГБНУ ВНИИБЗР

katrina7283@yandex.ru

Проведен ПЦР-анализ двух географических популяций энтомофага *Habrobracon hebetor* Say с использованием высокоспецифичных RAPD-праймеров (из г. Краснодара, Россия и г. Чимкента, Казахстан). Выявлены три RAPD-праймера (ОРА05, ОРВ04, УВС519), обладающие способностью дифференцировать популяции габробракона. Определены ДНК-маркеры специфические для Краснодарской и Чимкентской популяций энтомофага, позволяющие четко идентифицировать исследуемые популяции *H. hebetor*.

Ключевые слова: *Habrobracon hebetor* Say., ПЦР, RAPD-анализ, праймер, энтомофаги, популяция, внутривидовая дифференциация.

Введение. *Habrobracon hebetor* Say (Hymenoptera: Braconidae) является высокоэффективным энтомофагом чешуекрылых вредителей сои, подсолнечника, кукурузы, плодовых и овощных культур. Природные популяции габробракона способны снижать численность гусениц кукурузного мотылька до 22%, огородной совки – до 35%, хлопковой – до 45%, совки-гамма – до 30% [6]. Биологическая эффективность размноженного в искусственных условиях габробракона при небольших нормах выпуска (1-3 тыс. особей/га) против кукурузного мотылька, хлопковой совки, акациевой огневки достигает 70-90% [1].

Различные виды полезных насекомых, применяемых в качестве биоагентов, гетерогенны по своей структуре. Часто внутривидовые различия сводятся к различиям в агрессивности, что особенно важно учитывать в биологической защите растений. Популяции внутри вида могут иметь свои биологические особенности и пищевые предпочтения. Рядом исследователей отмечено, что трофические связи *H. hebetor* значительно варьируют, как в лабораторных, так и в полевых условиях [4].

В этой связи встает необходимость идентификации популяций внутри изучаемого вида. Одним из методов идентификации популяций и оценки внутривидовых различий может являться метод RAPD-PCR. С использованием RAPD-маркеров ранее были проведены исследования по генетическому картированию и наследованию отдельных локусов и аллелей генов [7], генетический анализ сцепления генов, ответственных за половые различия [9], а также анализ генетической структуры популяций *H. hebetor* [8].

В то же время до сих пор не выявлены RAPD-маркеры для идентификации различных географических популяций габробракона. В связи с этим целью данных исследований являлся поиск праймеров для дифференциации и ДНК-маркеров для идентификации различных популяций энтомофага *Habrobracon hebetor*.

Материал и методы. Исследования проводились на базе сектора биотехнологии ФГБНУ ВНИИБЗР в 2018 году. Объектом исследования являлись выборки насекомых (n=14) из Краснодарской (Россия) и Чимкентской (Казахстан)

лабораторных популяций *Habrobracon hebetor* Say (Hymenoptera: Braconidae). Выделение ДНК и амплификацию (RAPD-PCR) проводили по протоколам, описанным в методических рекомендациях [5]. В реакции ПЦР использовали 20 RAPD-праймеров со стандартной последовательностью нуклеотидов фирм Operon Technology (OP) и University of British Columbia (UBC): GT09; OPA02, 05, 06, 07, 15, 18, 20; OPB02, 04; OPD03, 12; OPE01, 07; UBC450, 519, 521, 531, 538, 556. Лабораторные опыты проводили с использованием следующего оборудования: амплификатор «iCycler» (Bio Rad, США), микроцентрифуга «MiniSpin» (Eppendorf, Германия), термостат для микропробирок «Термо 24» (Биокот, Россия), камеры для горизонтального электрофореза «Sub Cell-GT» (Bio Rad, США). Визуализацию продуктов амплификации проводили после предварительного окрашивания бромистым этидием на трансиллюминаторе ECX-20-M (Vilber Lourmat, Франция). Высокую специфичность праймера выявляли наличием относительно большого количества четких и ярко окрашенных ДНК-фрагментов и отсутствием пустых треков (дорожек) в гель-электрофорезе. Яркость окрашивания ДНК-фрагментов оценивали визуально по сравнению с окрашиванием маркерной ДНК.

Результаты и обсуждение. Ранее нами было проведено тестирование набора из 20 RAPD- и 16 ISSR-праймеров на специфичность и информативность к ДНК габробракона [2, 3]. В результате данного скрининга были отобраны два высокоспецифичных RAPD-праймера, которые можно использовать для дифференциации двух географических популяций *H. hebetor* (OPA10 и OPB01). Кроме того, было показано, что система RAPD-PCR более информативна, чем ISSR-PCR по отношению к нашему объекту исследований. Однако для внутривидовой дифференциации популяций необходимо проведение дальнейших исследований и поиск новых RAPD-праймеров. Так как двух праймеров было бы недостаточно для идентификации популяций необходимо было подобрать к ним еще как минимум один-два новых праймера.

Поэтому мы приобрели дополнительно 20 RAPD-праймеров, использованных другими авторами для анализа популяций *H. hebetor* [7-9]. Данные праймеры были протестированы на специфичность и информативность к ДНК *H. hebetor*. Большинство из них оказались пригодны для оценки ДНК-полиморфизма популяций габробракона, но только три из них, в конечном итоге, могли быть использованы для дифференциации и идентификации популяций исследуемого энтомофага: OPA05, OPB04, UBC519.

В общей сложности с использованием данных трех RAPD-праймеров было выявлено 20 ДНК-фрагментов, из которых 8 служили в качестве ДНК-маркеров, способных дифференцировать и идентифицировать популяции *H. hebetor*.

Можно заметить, что праймер OPA05 выявил два ДНК-маркера размером 500 и 700 пар нуклеотидов (п.н.). Эти фрагменты присутствовали только в Краснодарской популяции *H. hebetor* (рис. 1).

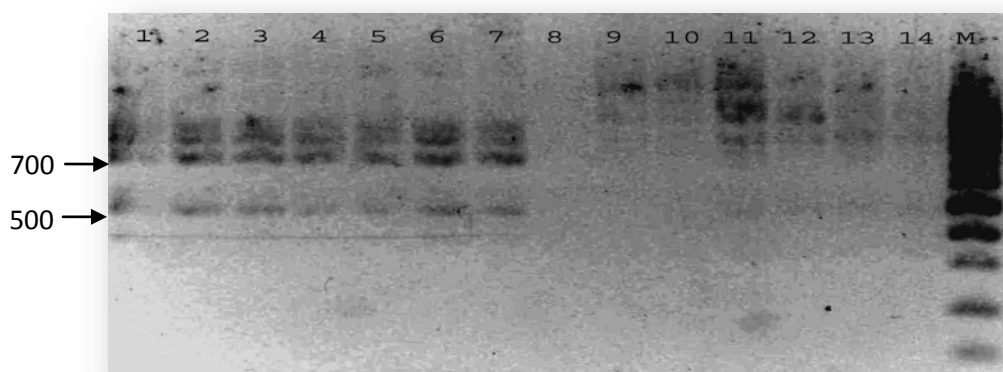


Рисунок 1 – Электрофореграммы продуктов RAPD-PCR в 1,8% агарозе с праймером ОРА05. Дорожки: 1-7 – ампликоны ДНК различных насекомых Краснодарской; 8-14 – Чимкентской популяции *H. hebetor*. М – маркерная ДНК (М100). Стрелками отмечены специфические для популяций ДНК-маркеры (пар нуклеотидов).

По праймеру ОРВ04 было выявлено два ДНК-фрагмента, присутствующие у Краснодарской популяции и отсутствующие у представителей Чимкентской популяции *Habrobracon hebetor*. Это были фрагменты с молекулярной массой приблизительно 220 и 800 пар нуклеотидов (рис. 2).

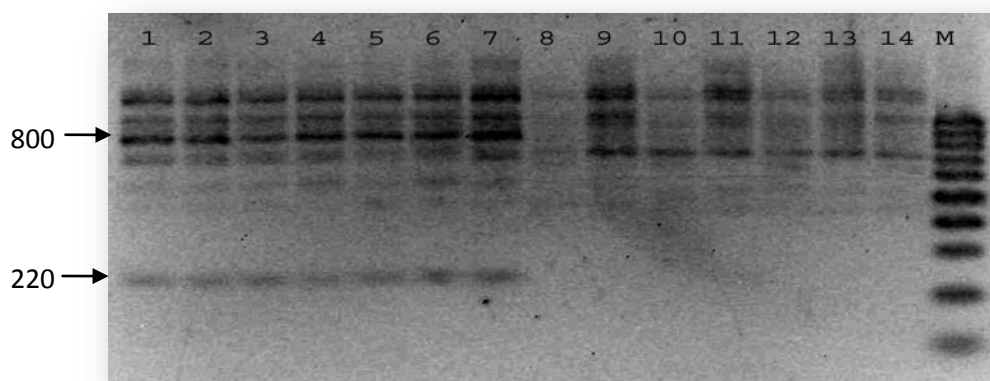


Рисунок 2 – Электрофореграммы продуктов RAPD-PCR в 1,8% агарозе с праймером ОРВ04. Дорожки: 1-7 – ампликоны ДНК различных насекомых Краснодарской; 8-14 – Чимкентской популяции *H. hebetor*. М – маркерная ДНК (М100). Стрелками отмечены специфические для популяций ДНК-маркеры (пар нуклеотидов).

В свою очередь, праймер UBC519 генерировал четыре ДНК-фрагмента, дифференцирующие исследуемые популяции. Это фрагменты размером 400, 550, 600 и 1200 пар нуклеотидов (рис. 3). При этом ДНК-фрагмент 550 п.н. наблюдали только в Краснодарской популяции, тогда как фрагменты 400, 600 и 1200 п.н. – только у Чимкентской популяции габробракона.

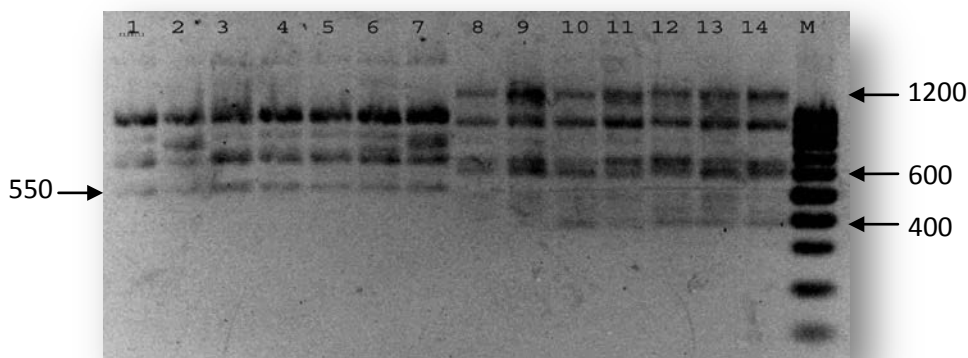


Рисунок 3 – Электрофореграммы продуктов RAPD-PCR в 1,8% агарозе с праймером UBC519. Дорожки: 1-7 – ампликоны ДНК различных насекомых Краснодарской; 8-14 – Чимкентской популяции *H. hebetor*. М – маркерная ДНК (M100). Стрелками отмечены специфические для популяций ДНК-маркеры (пар нуклеотидов).

Таким образом, RAPD-анализ двух исследуемых популяций насекомых по данным праймерам выявил ДНК-маркеры специфические для Краснодарской и Чимкентской популяций энтомофага, позволяющие четко идентифицировать исследуемые популяции *H. hebetor*. Для Краснодарской популяции это были RAPD-маркеры размером (примерно): 500 и 700 п.н. (ОРА05), 220 и 800 п.н. (ОРВ04), 550 п.н. (UBC519); для Чимкентской популяции: 400, 600 и 1200 п.н. (UBC519).

Заключение. Выявлены RAPD-праймеры, позволяющие проводить внутривидовые сравнения у энтомофага *Habrobracon hebetor*. Данные праймеры можно использовать для оценки генетического сходства и идентификации исследуемых популяций габробракона и, вероятно, могут быть использованы для идентификации и дифференциации других географических популяций энтомофага.

Литература

1. Агасьева И.С., Исмаилов В.Я., Киль В.И. и др. Изучение биологических особенностей популяций эктопаразита *Habrobracon hebetor* SAY (Hymenoptera, Braconidae) для биологической защиты растений // Биологическая защита растений - основа стабилизации агроэкосистем: сб. тр. международн. научн.-практич. конф. – 2016 г. – С. 106-111.
2. Беседина Е.Н. Генетическое разнообразие и полиморфизм ДНК краснодарской популяции эктопаразита *Habrobracon hebetor* SAY // Научное обеспечение инновационных технологий производства и хранения сельскохозяйственной и пищевой продукции: сб. тр. международн. научн.-практич. конф. – 2018. – С. 115-119.
3. Беседина Е.Н., Киль В.И. Молекулярно-генетический анализ различных географических популяций энтомофага *Habrobracon hebetor* по RAPD-маркерам // Приоритетные направления научного обеспечения агропромышленного комплекса России и стран СНГ: сб. тр. международн. научн.-практич. конф. – 2018. – С. 210-214.
4. Исмаилов В.Я., Агасьева И.С., Киль В.И. и др. Изучение биологических особенностей эктопаразита *Habrobracon hebetor* Say в целях оптимизации

биоценотической регуляции численности вредных чешуекрылых // Наука Кубани. – 2017. – № 4. – С. 26-33.

5. Киль В.И. Методика оценки ДНК полиморфизма популяций насекомых с помощью ПЦР (RAPD- и ISSR-PCR): метод. рекомендации – Краснодар: ООО «Просвещение-Юг», 2009. – 16 с.

6. Коваленков В.Г., Тюрина Н.М. Биоэкологические особенности бракона // Защита растений. – 1991. – № 7. – С. 17-19.

7. Antolin M.F., Bosio C.F., Cotton J. et al Intensive Linkage Mapping in a Wasp (*Bracon hebetor*) and a Mosquito (*Aedes aegypti*) With Single-Strand Conformation Polymorphism Analysis of Random Amplified Polymorphic DNA Markers // Genetics. – 1996. – V. 145. – № 4. – P. 1727-1738.

8. Antolin M.F., Ode P.J., Heimpel G.E. et al Population structure, mating system, and sexdetermining allele diversity of the parasitoid wasp *Habrobracon hebetor* // Heredity. – 2003. – V. 91. – № 4. – P. 373-381.

9. Holloway A.K., Strand M.R., Black W.C. et al Linkage Analysis of Sex Determination in *Bracon* sp. Near *hebetor* (Hymenoptera: Braconidae) // Genetics. – 2000. – V. 154. – P. 205-212.

SEARCH OF RAPD MARKERS FOR DIFFERENTIATION OF *HABROBRACON HEBETOR* SAY POPULATIONS OF ENTOMOPHAGE

Besedina E.N., Nastasy A.S.

PCR analysis of geographic populations of *Habrobracon hebetor* Say. (from Krasnodar, Russia and Chimkent, Kazakhstan) using highly specific RAPD-primers was conducted. There were revealed three RAPD primers (OPA05, OPB04, UBC519), with ability to differentiate entomophage populations. DNA markers specific to Krasnodar and Chimkent populations of entomophage were identified. They use allows to identify the studied *H. hebetor* populations precisely.

Keywords: *Habrobracon hebetor* Say., PCR, RAPD analysis, primer, entomophages, population, intra-species differentiation.