

УДК 595.773.4

**ПРИМЕНИМОСТЬ МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ ГЕНОВ COI, COII
И ЯДЕРНОГО ГЕНА 18S rDNA ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ
ВОСТОЧНОЙ ФРУКТОВОЙ МУХИ
BACTROCERA DORSALIS (HENDEL, 1912)
(DIPTERA, TEPHTRITIDAE)**

© 2020 г. Т. В. Галинская,^{1, 2*} М. Ю. Арапова,^{1, 2**} Н. Ю. Оюн,^{1, 3***}
И. О. Камаев^{2****}

¹Кафедра энтомологии Биологического факультета Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова
Ленинские горы, 1-12, Москва, 119234 Россия
*e-mail: nuha1313@gmail.com

²Научно-методический отдел энтомологии Всероссийского центра карантина растений
ул. Пограничная, 32, пос. Быково, Раменский р-н, Московская обл., 140150 Россия

³Институт медицинской паразитологии, тропических и трансмиссивных заболеваний
им. Е.И. Марциновского Сеченовского университета
ул. Малая Пироговская, 20 с.1, Москва, 119435 Россия
e-mail: maria.yurevna@bk.ru, *e-mail: nad_oyun@mail.ru,
****e-mail: ilyakamayev@yandex.ru

Поступила в редакцию 16.03.2019 г.

После доработки 26.04.2019 г.

Принята к публикации 26.04.2019 г.

Приводятся результаты изучения участков трех генов, COI, COII и 18S rDNA, карантинного вида *Bactrocera dorsalis*. Дается оценка применимости этих генов для молекулярной экспресс-диагностики этого вида. Показано, что ядерный ген малой субъединицы рибосомальной РНК 18S rDNA не может быть использован в этих целях, в отличие от митохондриальных генов COI и COII.

Ключевые слова: двукрылые, молекулярная диагностика, карантинные виды.

DOI: 10.31857/S0367144520010098

Род *Bactrocera* Macquart (Diptera, Tephritidae) – один из крупнейших в сем. Tephritidae, к настоящему времени он насчитывает 651 описанный вид (Vorobiova, Kamayev, 2017). Некоторые виды рода *Bactrocera* являются серьезными вредителями плодовых культур (White, Elson-Harris, 1992).

Восточная фруктовая муха *Bactrocera dorsalis* (Hendel, 1912) родом из Азии, в настоящее время встречается примерно в 65 странах, включая некоторые страны Америки и Океании и большую часть Африки (страны, расположенные к югу от Сахары). Восточная фруктовая муха – инвазионно-активный вид из-за высоких репродуктивного и биотического потенциалов (короткий жизненный цикл, до 10 поколений потомства

в год), способности к быстрому расселению и широкого спектра растений-хозяев (Clarke et al., 2005). *Bactrocera dorsalis* повреждает более 200 видов растений: плоды сахарного яблока (*Annona squamosa* L.), яблони (*Malus pumila* Mill.), банана (*Musa paradisiaca* L.), перца рода *Capsicum*, гуавы (*Psidium guajava* L.), манго (*Mangifera indica* L.), апельсина (*Citrus sinensis* (L.) Pers.) и других видов рода *Citrus*, папайи (*Carica papaya* L.), персика (*Persica vulgaris* Mill.), сливы (*Prunus domestica* L.), груши *Pyrus* spp. и др. Проникновению восточной фруктовой мухи в новые регионы мира способствует рост международной торговли и отчасти туризма (неконтролируемые перевозки зараженных вредителем плодов тропических культур) (CABI, 2019).

Видовой комплекс *Bactrocera dorsalis*, в который входит восточная фруктовая муха, насчитывает около 85 видов (Boykin, 2013), очень сходных по морфологическим признакам. В 2015 г. 3 вида комплекса (*B. papayae*, *B. philippinensis* и *B. invadens*) были сведены в синонимы к *B. dorsalis* (Schutze, 2015).

Филогения комплекса *B. dorsalis* анализировалась с использованием данных о нуклеотидных последовательностях генов COI, nad4-3, CAD, ITS1 и ITS2 (Boykin, 2013). Для комплекса *B. dorsalis* характерны внутривидовой полиморфизм и высокая изменчивость молекулярных маркеров митохондриального гена COI и двух ядерных генов – EF-1 α и *period*, что осложняет дифференциацию и идентификацию видов (Leblanc, 2015). В роде *Bactrocera* молекулярная филогения строилась на основании данных о строении генов COI (Jamnongluk et al., 2003), митохондриальных генов 16S rDNA и COI (Zhang, 2010) и COI, 16S rRNA, COII, tRNA (Lys), tRNA (Asp) (Smith et al., 2003).

Данные молекулярно-генетических исследований достоверны не во всех случаях, так как поддержки в узлах зачастую составляют менее 50 %. Для увеличения статистической достоверности необходимо проведение большего количества молекулярных исследований различных генов для данного вида, причем не только митохондриальных, но и ядерных.

В импортируемых плодах растений-хозяев *Bactrocera dorsalis* встречается чаще всего в личиночной стадии, значительно реже – как пупарии. Личинок идентифицируют по анатомо-морфологическим признакам (Кандыбина, 1977; White, Elson-Harris, 1992; Carroll et al., 2018; Камаев, 2017; и др.). Идентификация личинок мух-пестрокрылок крайне сложна даже для специалистов, так как набор диагностических признаков ограничен, а для личинок мух характерен высокий полиморфизм. До сих пор описаны личинки лишь небольшого числа видов рода *Bactrocera*. Отдельную проблему составляет невозможность достоверной видовой идентификации морфологическими методами личинок первого и второго возрастов. В связи с этим для фитосанитарной практики возрастает потребность в молекулярно-генетических методах диагностики личинок восточной фруктовой мухи.

В данной работе представлены результаты изучения участков митохондриальных генов COI, COII и ядерного гена малой субъединицы рибосомальной РНК 18S rDNA *Bactrocera dorsalis* и оценка применимости этих генов для молекулярной экспресс-диагностики.

Самцы *Vastrocera dorsalis* были выведены из личинок, поступивших с плодами манго из Таиланда с целью проведения лабораторной экспертизы во Всероссийском центре карантина растений (ФГБУ «ВНИИКР»).

Для определения видовой принадлежности склериты гениталий самцов были исследованы с помощью стандартной методики. Прегенитальные и генитальные части брюшка самца были отделены, выдержаны в 10%-ном растворе щелочи (КОН) в течение двух часов, затем отпрепарированы.

Для генетического анализа были использованы экземпляры мух, зафиксированные индивидуально в пробирках с 96%-ным этанолом. Исследованный материал хранится в коллекции кафедры энтомологии Биологического факультета Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова.

Методы генетического анализа

ДНК была выделена из одной ноги насекомого с помощью метода, описанного Галинской с соавт. (Galinskaya et al., 2016).

ПЦР была проведена с использованием праймеров (Folmer et al., 1994), представленных в таблице.

Для проведения ПЦР была использована готовая смесь для ПЦР ScreenMix-HS (ЗАО «Евроген Ру»). Реакция проводилась в объеме 25 мкл. Температурный профиль реакции: начальная денатурация 5 мин при 94 °С; 35 циклов, каждый включает 1 мин при 94 °С, 1 мин при 54 °С и 1 мин при 72 °С; финальная элонгация 4 мин при 72 °С.

Продукты амплификации были визуализированы с помощью электрофореза в 1%-ном агарозном геле с применением EtBr. Продукты амплификации были выделены из геля с помощью набора Cleanup Mini Kit (ЗАО «Евроген Ру»).

Секвенирование было проведено с прямого и обратного праймеров при помощи генетического анализатора ABI Prism 3130 × 1 (Applied Biosystems, США) с использованием BigDye™ Terminator v 3.1. Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, США).

Статистическая обработка сиквэнсов

Полученные хроматограммы прямого и обратного сиквэнсов каждого образца были совмещены и отредактированы в программе SeqMan (DNAStar, Madison, Wisconsin, USA) (SeqMan NGen®). Для построения деревьев мы использовали как полученные нами данные, так и взятые из базы данных GenBank NCBI (Benson et al., 2005).

Матрица попарных генетических дистанций исследованных видов, частота попарных генетических дистанций, коэффициент транзиции/трансверсии (R) (Kimura, 1980) и матрица нуклеотидных замен по модели Тамуры–Нея (Tamura, Nei, 1993) были подсчитаны в программе MEGA6 (Tamura et al., 2013).

Для анализа таксономического статуса исследованных представителей рода *Vastrocera* мы использовали метод обнаружения хиатуса между внутри- и межвидовыми генетическими дистанциями («barcoding gap») (Puillandre et al., 2012), реализованный в программе ABGD (K2P, ts/tv = 0.99, gap.pen = 1).

Примеры, использованные в настоящем исследовании

Название гена	Локализация гена	Название праймера	Последовательность праймера
COI	Митохондриальный	LCO1490	GGTCAACAATAATCATATAAAGATATTGG
COII	Митохондриальный	HCO2198	TAAACTTCAGGGTGACCCAAAAAATCA
COIII	Митохондриальный	COII-2a	GTTGTAAAAACGACGGCCAGTATAGAKCWTCYCCHTTAATAAACA
		COII-9b	CACAGGAAACAGCTATGACCCGTACTTGCTTTCSAGTCACTWATG
		COIII-Su	TAATAAGGCAGATTAGTGCA
		COIIIr-Su	GTTTAAACAGACCCAGTACTT
16S	Митохондриальный	16Sf-Su	CGCCTGTTTAAACAAAAACAT
		16Sr-Su	TGAACTCAGATCATGTAAAGAAA
18S	Ядерный	18S_2_3F	GTTCCGATCCGGAGAGGGGA
		18S_2_Bi	GAGTCTCGTTCGTTATCGGA
18S	Ядерный	18S_3_A2.0	ATGGTTGCAAAAGCTGAAAC
		18S_3_9R	GATCCCTCCGCAGGTTCSACCTAC

Модель нуклеотидных замен была выбрана в программе MEGA6 (Tamura et al., 2013); оптимальная модель – GTR + I.

Филогенетическое дерево было построено с помощью программы RAxML (Stamatakis, 2006) методом максимального правдоподобия (ML) с использованием модели GTR + Gamma (выбор модели объясняется ограниченным числом моделей, реализованных в используемой программе). В результате анализа было выбрано лучшее дерево. Бутстреп-поддержки (1000 репликаций) для каждой ветви указаны на дереве.

Филогенетическое байесово дерево было построено с помощью программы MrBayes 3.2.6 (Huelsenbeck, Ronquist, 2001; Ronquist, Huelsenbeck, 2003), байесовы постериорные вероятности поддержки каждого узла указаны на дереве; были проведены три независимых теста запуска с 30 млн. генераций, в финальную обработку выбиралось одно дерево на каждую тысячу генераций. Оставшиеся деревья были совмещены в консенсусное дерево по методу максимального доверия к кладе (Drummond, Rambaut, 2014). Дерево было визуализировано в программе FigTree v.1.4.2 (Rambaut, 2014).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Были амплифицированы участки генов COI и COII 6 экз. *Bactrocera dorsalis* и исследованы 3 сиквенса гена COI и 2 сиквенса гена COII.

Для сравнения были взяты 862 сиквенса гена COI исследованного участка из базы данных GenBank NCBI. В качестве данных внешней группы было взято 2 сиквенса вида *Dacus ciliatus* Loew, 1862. Деревья, построенные методами ML (Maximum Likelihood, метод максимального правдоподобия) и Bayes (байесов метод), имеют одинаковую топологию, и на рис. 1 совмещены. На деревьях видно, что клада, включающая все изученные экземпляры *B. dorsalis*, однородна и выделяется с высокой поддержкой (PS = 100, BS = 1). Внутривидовые генетические дистанции для *B. dorsalis* составляют от 0 до 0.1033, что значительно превышает диапазон внутривидовых генетических дистанций, обычно характерных для двукрылых (Hebert et al., 2003; Meier et al., 2006; Renaud et al., 2012; Galinskaya et al., 2014, 2016). Межвидовые генетические дистанции между *B. dorsalis* и *D. ciliatus* составляют от 0.1425 до 0.1993.

Из базы данных ГенБанк были взяты для сравнения также 11 сиквенсов гена COII того же участка, что исследован нами. В качестве внешней группы был взят 1 сиквенс *Dacus ciliatus*. Деревья, построенные методами ML и Bayes, имеют одинаковую топологию и на рис. 2 совмещены. Клада на рис. 2, включающая все изученные экземпляры *B. dorsalis*, однородна и выделяется с высокой поддержкой (PS = 100, BS = 1). Внутривидовые генетические дистанции для *B. dorsalis* составляют от 0 до 0.0023, что не превышает диапазон внутривидовых генетических дистанций, обычно характерных для двукрылых. Межвидовые генетические дистанции между *B. dorsalis* и *D. ciliatus* составляют от 0.1729 до 0.1776.

Участок гена 18S rDNA был амплифицирован у 6 экз. *Bactrocera dorsalis*, и 5 сиквенсов этого гена использованы в данной статье. Для сравнения из базы данных ГенБанк были взяты 2 сиквенса гена 18S rDNA того же участка, что изучен нами, а также сиквенсы аналогичного участка *Bactrocera jarvisi* (Tryon, 1927), *B. curvipennis* (Froggatt, 1909), *B. cucurbitae* (Coquillett, 1899) и *B. cucumis* (French, 1907). В качестве данных по внешней группе были взяты по 1 сиквенсу *Rhagoletis completa* Cresson, 1929, *Anastrepha grandis* (Macquart, 1846), *A. suspensa* (Loew, 1862) и *A. ludens* (Loew, 1873). Деревья,

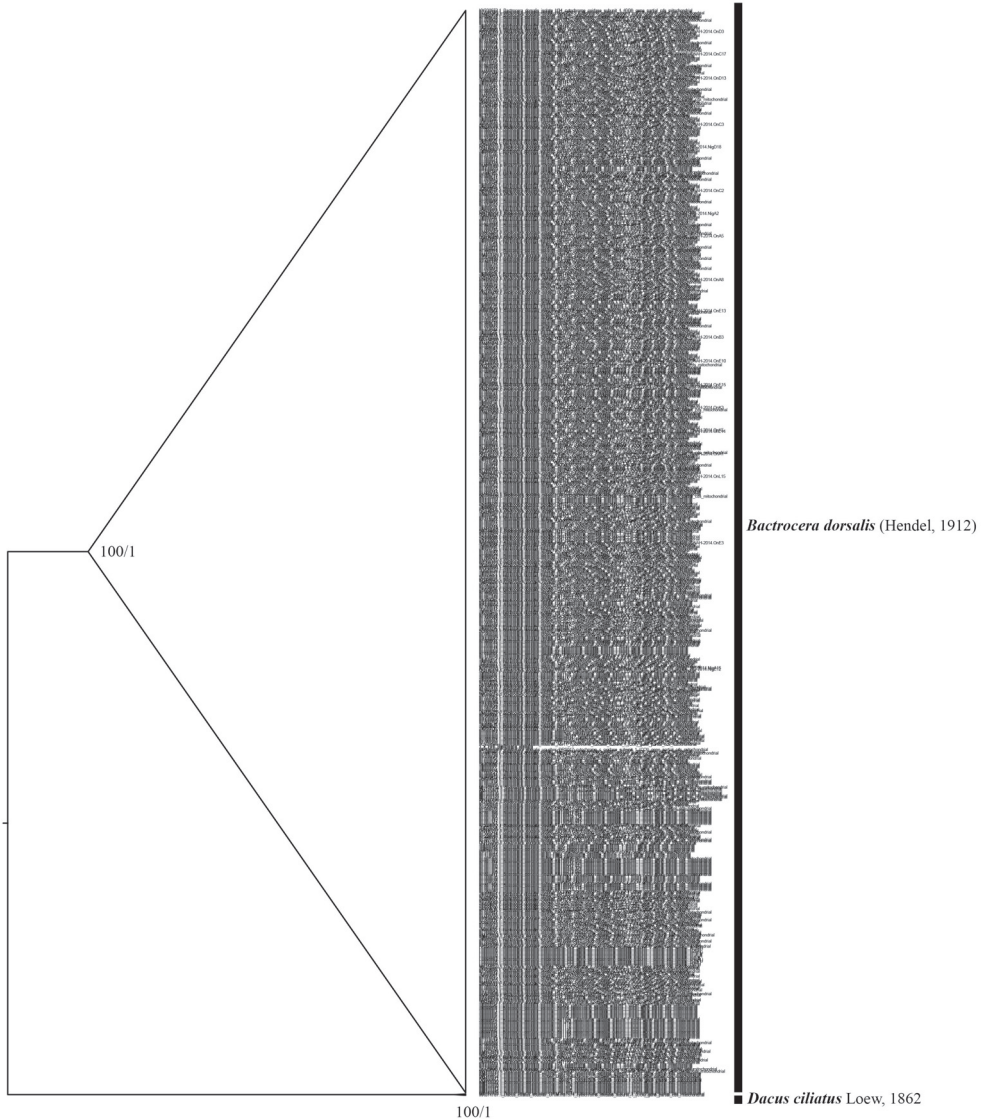


Рис. 1. Совмещенное филогенетическое дерево, построенное на основании последовательностей сиквенсов участка гена COI. Деревья, построенные методом максимального правдоподобия (ML) и байесовым методом (BS), имеют одинаковую топологию и на данном рисунке совмещены. Над узлами показаны бутстреп-поддержки / байесовы постериорные вероятности.

построенные методами ML и Bayes, имеют одинаковую топологию и на рис. 3 совмещены. На построенных деревьях клада, включающая все изученные экземпляры *B. dorsalis*, включает также *B. jarvisi*, *B. curvipennis* и *B. cucurbitae*, при этом клада однородна и выделяется с высокой поддержкой (PS = 100, BS = 1) (см. рис. 3). Внутривидовые генетические дистанции для *B. dorsalis* отсутствуют. Генетические дистанции между *B. dorsalis* и другими изученными видами рода *Bactrocera* составляют от 0 до

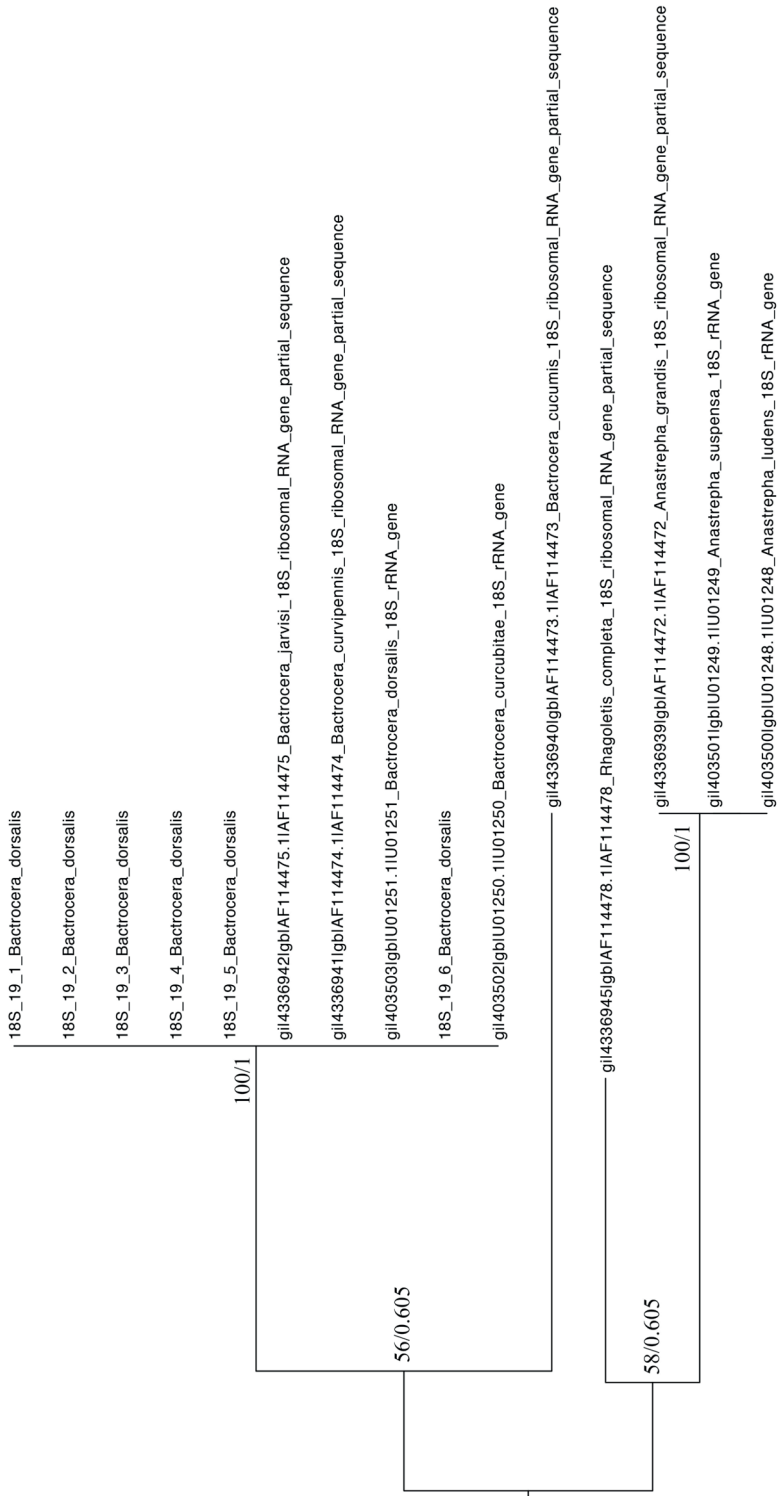


Рис. 3. Совмещенное филогенетическое дерево, построенное на основании последовательностей сиквенса участка гена 18S rDNA. Деревья, построенные методом максимального правдоподобия (ML) и байсовым методом (BS), имеют одинаковую топологию и на данном рисунке совмещены. Над узлами показаны бутстреп-поддержки / байсовы вероятности.

0.0317, что заметно меньше значений, обычно характерных для двукрылых. Генетические дистанции между родом *Bactrocera* и внешней группой (родами *Rhagoletis* и *Anastrepha*) составили от 0.0317 до 0.0556, что также значительно меньше межвидовых генетических дистанций, характерных для двукрылых.

ОБСУЖДЕНИЕ

На основании обработанных данных по двум митохондриальным и одному ядерному гену для восточной фруктовой мухи (*B. dorsalis*) можно заключить, что амплифицированный нами участок ядерного гена 18S rDNA не может быть применен для видовой диагностики, так как отсутствует хиатус между внутри- и межвидовыми дистанциями, нет различий между сиквенсами гена 18S rDNA *B. dorsalis* и некоторых других представителей рода *Bactrocera*.

При этом митохондриальные гены COI и COII, особенно при совместном использовании, могут послужить основой для разработки молекулярно-генетических методов диагностики (методом секвенирования, либо для разработки тест-систем для ПЦР в реальном времени) в фитосанитарной практике.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность специалистам Всероссийского центра карантина растений за помощь в сборе материала при выполнении данной работы.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа Т. В. Галинской выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 18-74-00035).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Камаев И. О. 2017. Идентификация личинок карантинных для Российской Федерации видов мух-пестрокрылок (Diptera: Tephritidae). Карантин растений: наука и практика **4** (22): 52–64.
- Кандыбина М. Н. 1977. Личинки плодовых мух-пестрокрылок (Diptera, Tephritidae). Л.: Наука, 212 с.
- Benson D. A., Karsch-Mizrachi I., Lipman D. J., Ostell J., Wheeler D. L. 2005. GenBank. Nucleic Acids Research **33**: 34–38.
- Boykin L. M. 2013. Multi-gene phylogenetic analysis of south-east Asian pest members of the *Bactrocera dorsalis* species complex (Diptera: Tephritidae) does not support current taxonomy. Journal of Applied Entomology **138**: 235–253.
- CABI Crop Protection Compendium [Интернет-документ] 2019. *Bactrocera dorsalis* (Oriental fruit fly) [URL: <http://www.cabi.org/cpc/datasheet/17685>]
- Carroll L. E., Norrbom A. L., Dallwitz M. J., Thompson F. C. [Интернет-документ] 2018. Pest fruit flies of the world – larvae. Version: 13th September 2018. [URL: www.delta-intkey.com].
- Clarke A. R., Armstrong K. F., Carmichael A. E., Milne J. R., Roderick G. K., Yeates D. K. 2005. Invasive phytophagous pests arising through a recent tropical evolutionary radiation: the *Bactrocera dorsalis* complex of fruit flies. Annual Review of Entomology **50**: 293–319.
- Drummond A., Rambaut A. [Интернет-документ] 2014. Summarizing posterior trees. [URL: <http://beast.bio.ed.ac.uk/summarizing-posterior-trees>]
- Folmer O., Black M., Hoeh W., Lutz R., Vrijenhoek R. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome C oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. Molecular Marine Biology and Biotechnology **3**: 294–299.
- Galinskaya T. V., Suvorov A., Okun M., Shatalkin A. I. 2014. DNA barcoding of Palaearctic Ulidiidae (Diptera: Tephritoidea): morphology, DNA evolution and Markov codon models. Zoological Studies **53** (51): 1–17.
- Galinskaya T. V., Oyun N. Yu., Teterina A. A., Shatalkin A. I. 2016. DNA barcoding of Nothybidae (Diptera). Oriental Insects **50** (2): 69–83. doi: 10.1080/00305316.2016.1174747

- Hebert P. D. N., Ratnasingham S., de Waard J. R. 2003. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit I divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **270**: 96–S99.
- Huelsenbeck J. P., Ronquist F. 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogeny. *Bioinformatics* **17**: 754–755.
- Jamnongluk W., Baimai V., Kittayapong P. 2003. Molecular evolution of tephritid fruit flies in the genus *Bactrocera* based on the cytochrome oxidase I gene. *Genetica* **119** (1): 19–25.
- Kimura M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* **16**: 111–120.
- Leblanc L. 2015. A phylogenetic assessment of the polyphyletic nature and intraspecific color polymorphism in the *Bactrocera dorsalis* complex (Diptera, Tephritidae). *ZooKeys* **540**: 339–367.
- Meier R., Shiyang K., Vaidya G., Ng P.K. 2006. DNA barcoding and taxonomy in Diptera: a tale of high intraspecific variability and low identification success. *Systematic Biology* **55**: 715–728.
- Puillandre N., Lambert A., Brouillet S., Achaz G. 2012. ABGD, automatic barcode gap discovery for primary species delimitation. *Molecular Ecology* **21** (8): 1864–1877.
- Rambaut A. [Интернет документ] 2014. Tree figure drawing tool version 1.4.2 2006–2014. [URL: [http:// tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/](http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/)]
- Renaud A. K., Savage J., Adamowicz S. J. 2012. DNA barcoding of Northern Nearctic Muscidae (Diptera) reveals high correspondence between morphological and molecular species limits. *BMC Ecology* **12** (24): 1–15.
- Ronquist F., Huelsenbeck J. P. 2003. MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* **19**: 1572–1574.
- Schutze M. K. 2015. Synonymization of key pest species within the *Bactrocera dorsalis* species complex (Diptera: Tephritidae): taxonomic changes based on a review of 20 years of integrative morphological, molecular, cytogenetic, behavioural and chemoecological data. *Systematic Entomology* **40** (2): 456–471.
- SeqMan NGen®. Version 6.0. DNASTAR. Madison, WI.
- Smith P. T., Kambhampati S., Armstrong K. A. 2003. Phylogenetic relationships among *Bactrocera* species (Diptera: Tephritidae) inferred from mitochondrial DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **26**: 8–17.
- Stamatakis A. 2006. RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics* **22** (21): 2688–2690.
- Tamura K., Nei M. 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution* **10**: 512–526.
- Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipiński A., Kumar S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* **30**: 2725–2729.
- Vorobiova L. V., Kamayev I. O. 2017. Taxonomic status and invasive activity of Oriental fruit fly *Bactrocera dorsalis* (Diptera: Tephritidae). *Plant Health: Research and Practice* **2** (20): 50–56.
- White I. M., Elson-Harris M. M. 1992. *Fruit Flies of Economic Significance: Their Identification and Bionomics*. Oxon, UK: CAB International, 601 p.
- Zhang B. 2010. Molecular phylogeny of *Bactrocera* species (Diptera, Tephritidae, Dacini) inferred from mitochondrial sequences of 16S rDNA and COI sequences. *Florida Entomologist* **93** (3): 369–377.

THE APPLICABILITY OF MITOCHONDRIAL GENES COI, COII AND NUCLEAR GENE 18S rDNA FOR DIAGNOSTIC OF EASTERN FRUIT FLY *BACTROCERA DORSALIS* (HENDEL, 1912) (DIPTERA, TEPHRITIDAE)

T. V. Galinskaya, M. Yu. Arapova, N. Yu. Oyun, I. O. Kamayev

Key words: Diptera, molecular diagnostics, quarantine species.

SUMMARY

The results of the study of three genes, COI, COII and 18S rDNA, for the quarantine species *Bactrocera dorsalis* are presented. An assessment of the applicability of these genes for molecular rapid diagnosis is given. It has been shown that the nuclear 18S rDNA gene of the small ribosomal subunit cannot be used for this purpose, in contrast to the mitochondrial COI and COII genes.