

УДК 577.29

## РАЗРАБОТКА ТЕСТ-СИСТЕМЫ НА ОСНОВЕ ПЦР ДЛЯ ВИДОВОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ ЖЕРТВЫ ПО СОДЕРЖИМОМУ КИШЕЧНИКА ХИЩНЫХ КЛОПОВ СЕМЕЙСТВА MIRIDAE (INSECTA: HETEROPTERA)

**И.М. Пазюк, Ю.М. Малыш, Ю.С. Токарев**

*Всероссийский НИИ защиты растений, Санкт-Петербург, Пушкин, Россия, ipazyuk@gmail.com*

Подходы молекулярной генетики находят самое широкое применение в разнообразных областях биологии. В частности, методы видовой идентификации, основанные на ПЦР, могут применяться в отношении образцов ДНК жертвы в содержимом кишечника хищника, что может быть использовано для прецизионного экспресс-анализа трофических предпочтений последнего. В рамках настоящей работы нами разработан набор олигонуклеотидных зондов, специфически амплифицирующих фрагменты мтДНК двух хищных клопов *Macrolophus pygmaeus* и *Nesidiocoris tenuis* и их потенциальных жертв – тепличной белокрылки *Trialeurodes vaporariorum* и персиковой тли *Myzus persicae*. Апробация ПЦР-зондов показала их пригодность для видовой идентификации жертвы в отношении проб ДНК, экстрагированных кишечников клопов, питавшихся тем или иным видом жертвы.

**Ключевые слова:** полифаги, *Macrolophus*, *Nesidiocoris*, *Trialeurodes*, *Myzus*, трофические предпочтения, мтДНК, цитохром оксидаза, цитохром b.

Клопы *Macrolophus pygmaeus* Rambur и *Nesidiocoris tenuis* Reuter (Miridae) являются хищниками-полифагами [Wheeler, 2000]. В теплицах и на открытых полях овощных культур они питаются табачной и оранжерейной белокрылками, трипсами, тлями, минерами, паутиными клещами, яйцами чешуекрылых [Torreno, 1994; Urbaneja, et al., 2005; Пазюк, 2011]. Наряду с поеданием различных видов вредных насекомых и клещей, эти слепняки так же питаются растениями, т.е. имеют смешанный тип питания.

Ряд хищников, несмотря на широкий круг потенциальных жертв, демонстрирует предпочтения в питании

тем или иным видом. Например, *M. caliginosus* Wagner при возможности выбора предпочитал тлю *Myzus persicae* Sulz. паутиному клещу *Tetranychus urticae* Koch [Foglar et al., 1990; Moayeri et al., 2006], белокрылку *Trialeurodes vaporariorum* Westwood белокрылке *Bemisia tabaci* Gennadius [Bonato et al., 2006]. Хищные клопы-полифаги *Orius laevigatus* Fieber и *Orius majusculus* Reuter (Anthocoridae) в тесте при питании белокрылкой *B. tabaci* и трипсом *Francliniella occidentalis* Pergande в значительной степени предпочитали трипсов [Arno J. et al., 2008].

Пищевые предпочтения многих видов хищных клопов изучены крайне слабо, так как традиционно данные исследования сопряжены с целым рядом методических трудностей. С другой стороны, современные достижения молекулярной биологии позволяют проводить видовую идентификацию биологических образцов в самом разном состоянии, включая содержимое кишечника, открывают новые возможности в данном направлении [Schmidt et al., 2009; Ito et al., 2013].

В рамках настоящей работы нами разработан набор олигонуклеотидных зондов (праймеров) к фрагментам гена первой субъединицы цитохром оксидазы или цитохрома b мтДНК двух хищных клопов *M. pygmaeus* и *N. tenuis* и их потенциальных жертв – тепличной белокрылки *T. vaporariorum* и персиковой тли *M. persicae*. Каждая

из четырёх пар праймеров специфически амплифицирует фрагмент мтДНК одного из четырёх перечисленных видов насекомых, соответственно, все четыре фрагмента различаются по длине, а температура отжига праймеров находится в диапазоне от 61 до 63 °С что позволяет использовать данную систему в виде мультиплексной смеси (табл.), в которой зонд, амплифицирующий ДНК хищника, служит в качестве внутреннего контроля.

Апробация ПЦР-зондов показала их пригодность для видовой идентификации жертвы в отношении проб ДНК, экстрагированных кишечников клопов, питавшихся тем или иным видом жертвы, что позволяет рекомендовать данную систему для изучения предпочтений данных видов клопов по отношению к модельным жертвам – тле и белокрылке.

Таблица. Мультиплексные праймеры для видовой индентификации двух видов хищных клопов и их потенциальных жертв

Праймер	Локус	5'-3' последовательность	Tm, °C	Длина, н.о.	GC, %	Длина продукта, н.о.
Nest1F	COI	ATGAACAGTATACCCTCCTCTGTC	61.5	24	45	211
Nest1R		AAGAGTAAGGCAGTGATTCCTGTG	63	24	45	
Macp1F	COI	CACCCGACATAGCATTCCTC	61.3	21	52	288
Macp1R		CGTTCTGATGATACCTTGTGGTC	61.5	25	44	
Triv1F	cytB	GGGATTTTCTGTTGATAATGCAACTC	61.5	26	38	148
Triv1R		ATAAGATCTTGTCAACCCAGCAG	60.9	24	43	
Myzp1F	cytB	ATATAGAAATTTTGATAAAATTACATTCTCACC	61	36	25	169
Myzp1R		GTAGGTGTAACATTTGGGTTTGCTA	60.9	25	40	

Название праймеров соответствует виду насекомого: *Nesidiocoris tenuis* (Nest), *Macrolophus pygmaeus* (Macp), *Trialeurodes vaporariorum* (Triv), *Myzus persicae* (Myzp). COI – первая субъединица цитохром оксидазы, cytB – цитохром b, Tm – температура плавления праймеров, GC – процентное содержание гуанина и цитозина в составе нуклеотидной последовательности праймера

#### Библиографический список (References)

- Пазюк И.М. Перспективы использования клопов зоофитофагов из семейства Miridae (Heteroptera) в биологической защите растений // Информ. бюл. ВПРС МОББ, 2011. N 42. с. 154–158
- Arno J., Roig J., Riudavets J. Evaluation of *Orius majusculus* and *Orius laevigatus* as predators of *Bemisia tabaci* and estimation of their prey preference // Biological Control, 2008. N 44. p. 1–6
- Bonato O., Couton L., Fargues J. Feeding preference of *Macrolophus caliginosus* (Heteroptera: Miridae) on *Bemisia tabaci* and *Trialeurodes vaporariorum* (Homoptera: Aleyrodidae) // J. Econ. Entomol., 2006. Vol. 99. iss. 4. p. 1143–1151
- Foglar H., Malausa J.C., Wainberg E. The functional response and preference of *Macrolophus caliginosus* (Heteroptera: Miridae) for two of its prey: *Myzus persicae* and *Tetranychus urticae* // Entomophaga, 1990. Vol. 35. p. 465–474
- Ito M., Watanabe M., Watanabe E., Miura K. Gut content analysis to study predatory efficacy of *Nesidiocoris tenuis* (Reuter) (Hemiptera: Miridae) by molecular methods // Entomological Science, 2013. N 16. p. 145–150
- Moayeri H.R.S., Ashouri A., Brødsgaard H.F., Enkegaard A. Odour-mediated preference and prey preference of *Macrolophus caliginosus* between spider mites and green peach aphids // J. Appl. Entomol., 2006. Vol. 130. iss. 9–10. p. 504–508
- Torreno H. Predation behavior and efficiency of the bug *Cyrtopeltis tenuis* (Hemiptera: Miridae), against the cutworm, *Spodoptera litura* (F.). Philippine Entomol., 1994. N 9. p. 426–434
- Urbaneja, A., Tapia G., Stansly P. Influence of host plant and prey availability on developmental time and survivorship of *Nesidiocoris tenuis* (Het.: Miridae) // Biocontrol Science and Technology, 2005. Vol. 15. N 5. p. 513–518
- Wheeler A.G. Predacious Plant bugs (Miridae) // Heteroptera of economic importance. C. W. Schaefer, A. R. Panizzi. –CRC Press LLS, 2000. p. 667–668

Plant Protection News, 2016, 3(89), p. 127–128

## DEVELOPMENT OF A PCR-BASED ASSAY FOR PREY SPECIES IDENTIFICATION IN GUT CONTENT OF PREDATORY BUGS OF THE FAMILY MIRIDAE (INSECTA: HETEROPTERA)

I.M. Pazyuk, Yu.M. Malysh, Yu.S. Tokarev

All-Russian Institute of Plant Protection, ipazyuk@gmail.com

Molecular genetics approaches are widely exploited in diverse fields of biology. In particular, PCR -based species identification methods may be applied to prey DNA samples in gut content of the predator to assay trophic preferences of the latter. Within the frames of the present work a set of oligonucleotide probes was developed which specifically amplified gene fragments of cytochrome oxidase subunit I of mtDNA of two predatory bugs *Macrolophus pygmaeus* and *Nesidiocoris tenuis* and their potential prey – glasshouse whitefly *Trialeurodes vaporariorum* and peach aphid *Myzus persicae*. Apronation of the probes showed their reliability for species identification for DNA samples extracted from guts of the bugs feeding on different prey species.