

УДК 632.752

DOI: 10.36305/0513-1634-2022-145-178-184

**АНАЛИЗ ИЗМЕНЧИВОСТИ МИТОХОНДРИАЛЬНОГО ГЕНА COI И
ДИАГНОСТИКА ФОНАРНИЦЫ *LYCORMA DELICATULA* (WHITE, 1845)
(HEMIPTERA, FULGOROIDEA, FULGORIDAE)**

**Марьям Константиновна Миронова¹, Андрей Владимирович Шипулин²
Илья Олегович Камаев³**

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Всероссийский центр
карантина растений» 140150, Московская область, Быково,
г. Раменское, р.п. Быково, ул. Пограничная, д. 32
E-mail: ¹mironam@mail.ru, ^{2,3}schipulin.andrey2016@yandex.ru

Фонарница *Lycorma delicatula* является инвазионным видом полужесткокрылых насекомых, чья вредоносность проявляется во вторичном ареале. Распространение этого вида происходит главным образом на преимагинальных стадиях, которые не идентифицируются морфологическими методами. Применение ДНК-баркодинга по фрагменту митохондриального гена COI для диагностики данного вида ограничено отсутствием оценки его внутривидовой и межвидовой изменчивости. По результатам анализа последовательностей данного маркера, фонарница *Lycorma delicatula* хорошо дифференцируется от прочих видов в пределах семейства Fulgoridae и рода *Lycorma* (бутстреп-поддержка ≥ 85%). Среднее значение генетических дистанций по двухпараметрической модели Кимуры для *Lycorma delicatula* в первичном ареале равнялось 1,2%, варьируя в диапазоне 0-3,8%. Для *Lycorma delicatula* характерно наличие порога между внутривидовой и межвидовой изменчивостью, который составляет 5,0%. Полученные результаты имеют практическое значение для деятельности фитосанитарных лабораторий.

Ключевые слова: энтомология; инвазионный вид; молекулярная генетика; фитосанитария; ДНК-баркодинг

Введение

Фонарница *Lycorma delicatula* (рис. 1) – инвазионный вид растительноядных насекомых, проявившая свои вредоносные свойства при расселении во вторичном ареале, в наибольшей степени на винограде и плодовых культурах [3]. Расселение *Lycorma delicatula* происходит главным образом посредством импортирования и перемещения грузов, включая посадочный материал растений-хозяев, из мест обитания вида. При этом наиболее вероятно, что насекомые этого вида распространяются яйцекладками, часто размещенными под восковым покрытием, которое защищает от неблагоприятных воздействий среды [3]. Идентификация *Lycorma delicatula* морфологическими методами по преимагинальным стадиям к настоящему времени не представляется возможной, в связи с чем актуальной является разработка соответствующих молекулярно-генетических методов диагностики.

Широко распространенным методом молекулярно-генетической диагностики насекомых в фитосанитарии является использование ДНК-баркодинга на основе последовательностей фрагмента митохондриального гена COI [8]. Применимость этого участка генома в качестве молекулярного маркера для Fulgoroidea показана в филогенетических исследованиях [3, 10, 12-13], а также при разработке метода выявления обсуждаемого вида фонарницы в экосистемах [11]. При этом в отношении *Lycorma delicatula* внутривидовая изменчивость последовательностей гена COI не определена, также, как и не оценены межвидовые генетические различия на уровне рода. Последнее фактически затрудняет применение ДНК-баркодинга для диагностики фонарницы в практике фитосанитарных лабораторий. В связи с этим целесообразно оценить внутривидовые и межвидовые генетические различия для *Lycorma delicatula* и

определить наличие между ними «порога» («*barcoding gap*») [9] для строгой дифференциации целевого объекта методом ДНК-баркодинга.



Рис. 1 Фонарица *Lycorma delicatula* Южная Корея (фото И.О. Камаева)

Объекты и методы исследования

Были проанализированы доступные из ГенБанка (GenBank NCBI [4]) нуклеотидные последовательности «фолмеровского» фрагмента гена COI (~700 п.о.) 43 видов Fulgoroidea, включая рассматриваемый вид *Lycorma delicatula* (n=266) и близкий к нему *Lycorma meliae* (Kato, 1929) (n=2). Все последовательности были выравнены с помощью алгоритма ClustalW в программе MEGA 7.

Построение дендрограмм методом максимального правдоподобия (ML) проводилось в программе MEGA 7 на основе матриц дистанций двухпараметрической модели Кимуры [6]. В качестве внешней группы были использованы оригинальные нуклеотидные последовательности представителей надсемейства Coccoidea. Статистическое подтверждение корректности дендрограмм (бутстреп-поддержка) рассчитывали с помощью бутстреп-анализа 500 альтернативных деревьев, которое дано в процентах от исходного значения.

Для оценки разницы между внутривидовой и межвидовой изменчивости были проанализированы нуклеотидные последовательности видов рода *Lycorma* и некоторых родов Fulgoridae с помощью метода Automatic Barcode Gap Discovery (ABGD) [9]. с предустановленными параметрами, включающими двухпараметрическую модель Кимуры.

Результаты и обсуждение

На первом этапе проводили отбор последовательностей гена COI для дальнейшего анализа изменчивости. В целом, топология полученной дендрограммы, построенной с помощью метода максимального правдоподобия (рис. 2), согласуется с данными предшествующих исследований [12, 13]. Анализируемые виды Fulgoroidea обособлялись в отдельную группу. Следует отметить, что клада Fulgoridae характеризовалась низкой бутстреп-поддержкой (19%), также, как и отдельные клады внутри неё. Это согласуется с выводом Urban и Cryan (2009) о том, что существующая система семейства не является естественной, так как филогенетически не обоснована. При этом виды рода *Lycorma* хорошо дифференцируются от остальных представителей Fulgoridae (бутстреп-поддержка >85%). Внутри этой клады последовательности

Lycorma delicatula обособляются от *Lycorma meliae* с высокой бутстрэп-поддержкой (85%).

Таблица 1

Средние значения генетических дистанций (%) между четырьмя географическими популяциями *Lycorma delicatula*

	Китай (n=176)	Япония (n=10)	Южная Корея (n=70)	США (n=10)
Китай	1,2	-	-	-
Япония	1,2	0	-	-
Южная Корея	1,1	0	0	-
США	1,2	0	0	0

Анализ генетической изменчивости фрагмента гена COI *Lycorma delicatula* был проведен для четырех географических популяций из первичного (Китай) и вторичного ареала (Япония, Южная Корея и США). В популяции из Китая значение генетических дистанций (GD) варьировало в диапазоне 0-3,8%, составляя в среднем 1,2% (табл. 1), тогда как для остальных популяций этот показатель был равен нулю. Для дальнейшего анализа был выбран образец *Lycorma delicatula* (MT079612.1) из Китая, который был генетически сходен с 66% всех исследованных образцов (GD=0%) (табл. 2).

Таблица 2

Значение показателя генетических дистанций (GD) между *Lycorma delicatula* (MT079612.1, регион происхождения: Китай), *Lycorma meliae* и отдельными представителями семейства Fulgoridae

Название вида [код Генбанка]	GD, %
<i>Lycorma meliae</i> (Kato, 1929) [NC 056249.1, MT079725.1]	5,4
<i>Limois</i> sp. [MW662660.1]	16,2
<i>Aphaena amabilis</i> (Hope, 1843) [MN025522.1]	17,6
<i>Aphaena discolor</i> Guerin-Meneville, 1834 [MN025523.1]	17,7
<i>Pyrops clavatus</i> (Westwood, 1839) [MW662665.1]	18,3
<i>Penthicodes variegata</i> (Guerin-Meneville, 1829) [MW662664.1]	19,3
<i>Geisha distinctissima</i> (Walker, 1858) [FJ230961.1]	19,6
<i>Laternaria candelaria</i> (Linnaeus, 1758) [FJ006724.1]	20,6

Значение GD между видами *Lycorma delicatula* и *Lycorma meliae* составляло в среднем 5,4% (табл. 2), тогда как в сравнении с другими представителями родов семейства Fulgoridae этот показатель был значительно выше (в нашем случае диапазон значений составлял 16,2-20,6%). Аналогичные результаты ранее получены для представителей двух семейств Fulgoroidea: Fulgoridae [3] и Delphacidae из Центральной части Аргентины [1]. В частности, для Fulgoridae (86 образцов), по данным Fottit et al. [3]¹, внутривидовая изменчивость варьировала в пределах 0-2,3%, в среднем составляя 0,4%; между видами в пределах рода этот показатель в среднем был равен 8,8% (диапазон значений – 0,2-16,5%), в пределах семейства – 19,0% (7,9-28,9%) (рис. 2).

¹ В данной работе виды рода *Lycorma* исследованы не были, а показатели генетических дистанций, рассчитанные по двухпараметрической модели Кимуры, даны без детализации по конкретным родам и видам Fulgoridae.

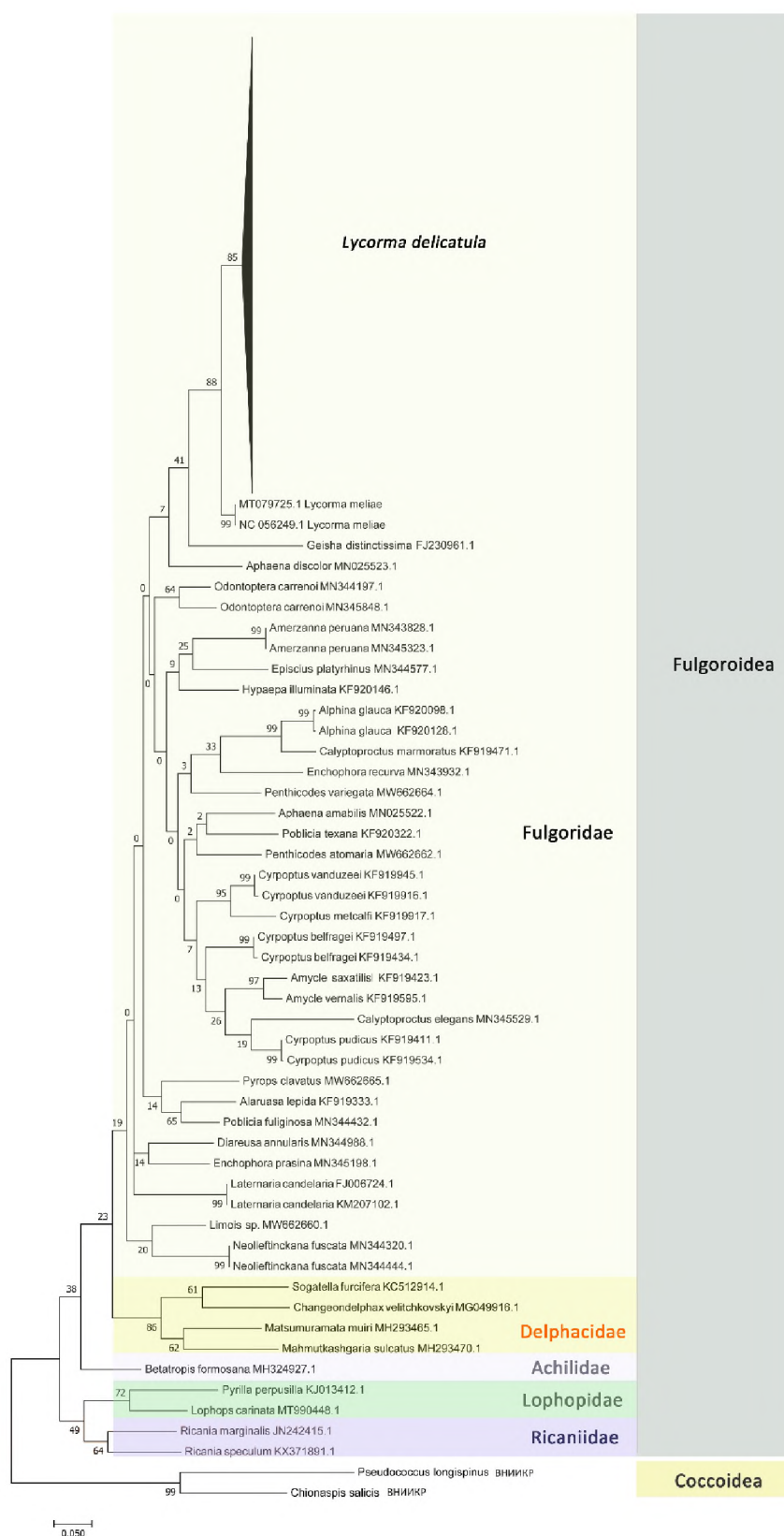


Рис. 2 Дендрограмма сходства (ML) последовательностей фрагмента гена COI исследуемых видов Fulgoroidea (приведены названия видов и код образца из ГенБанка или ВНИИКР), включая *Lycorma delicatula*. Результаты бутстреп-анализа даны в процентах над ветвями

Анализ нуклеотидных последовательностей *Lycorma delicatula* и *Lycorma meliae* методом ABGD показывает (рис. 3), что генетические дистанции этих видов не перекрываются, то есть наблюдается «barcoding gap». При этом образуемый порог в 5.0% разграничивает целевой вид фонарницы от *Lycorma meliae*.

Исходя из полученных данных для практического применения в практике фитосанитарных лабораторий при проведении идентификации *Lycorma delicatula* с помощью ДНК-баркодинга по фрагменту гена COI предлагается следующее. Полученные последовательности испытуемого образца сравниваются с образцом *Lycorma delicatula* (MT079612.1), выделенным в нашем исследовании в качестве референтного, путем расчёта генетических дистанций по двухпараметрической модели Кимуры. Образцы со значением $GD < 5.0\%$ идентифицируются как *Lycorma delicatula*.

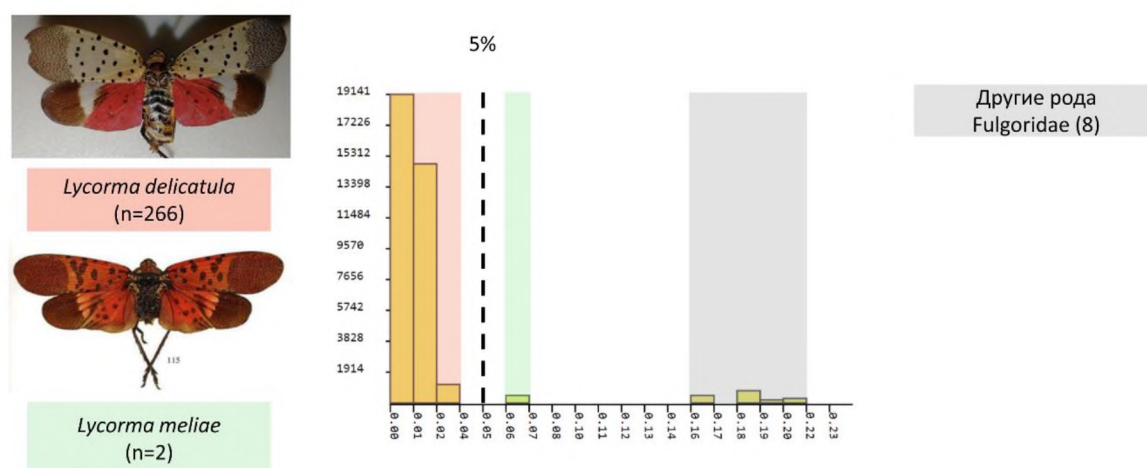


Рис. 3 Попарное сравнение генетических дистанций последовательностей COI видов рода *Lycorma* и представителей 8 родов Fulgoridae с помощью программы ABGD.

По оси X – генетические дистанции между последовательностями. По оси Y – число пар образцов (исследуемых нуклеотидных последовательностей). Пунктирной линией показан «barcoding gap».

Изображение *Lycorma delicatula* (Зоомузей МГУ) – фото Ю.А. Ловцовой; изображение *Lycorma meliae* – из Nagai, Porion [7]

Заключение

Анализ последовательностей участка митохондриального гена COI инвазионного вида фонарницы *Lycorma delicatula*, имеющего потенциальное фитосанитарное значение для территории Российской Федерации, с помощью дендрограммы, построенной методом максимального правдоподобия, показал, что данный вид хорошо дифференцируется от прочих в пределах семейства Fulgoridae и рода *Lycorma*.

В данной работе впервые проведена оценка генетической изменчивости *Lycorma delicatula* по выбранному молекулярному маркеру. Показано, что среднее значение генетических дистанций по двухпараметрической модели Кимуры для *Lycorma delicatula* в первичном ареале составило 1,2%, варьируя в диапазоне 0–3,8%. В ходе работы была выделена референтная последовательность COI для исследуемого вида фонарницы (MT079612.1).

Для *Lycorma delicatula* характерно наличие порога между внутривидовой и межвидовой изменчивостью, который на внутривидовом уровне составляет 5,0%. Полученные результаты имеют практическое значение для фитосанитарной практики при применении ДНК-баркодинга на основе гена COI с целью идентификации *Lycorma delicatula*. Образцы, сравниваемые с референтной последовательностью и

характеризующиеся значением генетических дистанций <5,0%, предложено идентифицировать как *Lycorma delicatula*.

Благодарности

Авторы выражают благодарность за фотографию образца фонарницы Ю.А. Ловцовой (ФГБУ «ВНИИКР») и специалистам Зоологического музея МГУ.

Работа выполнена в рамках темы НИОКТР 122041400185-2

Список литературы

1. Caro E.A., Dumon A.D., Mattio M.F., Alemandri V., Truol G. A molecular framework for the identification of planthopper vectors (Hemiptera: Delphacidae) of central Argentina // Bulletin of Entomological Research. – 2015. – № 105(6). P. 754-762. DOI: 10.1017/S0007485315000735
2. EPPO Global Database. – [Электронный ресурс] – URL: <https://gd.eppo.int>
3. Foottit R.G., Maw E., Hebert P.D. DNA barcodes for Nearctic Auchenorrhyncha (Insecta: Hemiptera) // PLoS one. – 2014. – Т. 9. – №. 7. – P. 10. DOI: 10.1371/journal.pone.0101385
4. GenBank NCBI. – [Электронный ресурс] – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>
5. Govender A. Testing the utility of DNA barcoding in South African Hemiptera: using eThekweni species as a case study (Doctoral dissertation). – 2017. – P. 100. – [Электронный ресурс] – URL: <http://hdl.handle.net/10413/14940>
6. Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences // Journal of Molecular Evolution. – 1980. – № 16. – P. 111-120.
7. Nagai S., Porion T. Fulgoridae 2. Catalogue illustre des faunes asiatique et australienne // Sciences Nat, Compiègne. – 1996. – P. 1-80.
8. PM 7/129 (2). DNA barcoding as an identification tool for a number of regulated pests. // EPPO Bulletin. – 2021. – № 51(1). P. – 100-143. DOI: 10.1111/epp.12724.
9. Puillandre N., Lambert A., Brouillet S., Achaz G. ABGD, Automatic Barcode Gap Discovery for primary species delimitation // Mol Ecol. – 2012. – [Электронный ресурс] – URL: <http://www.abi.snv.jussieu.fr/public/abgd/>
10. Urban J.M., Cryan J.R. Entomologically famous, evolutionarily unexplored: the first phylogeny of the lanternfly family Fulgoridae (Insecta: Hemiptera: Fulgoroidea) // Molecular Phylogenetics and Evolution. – 2009. – № 50. – P. 471-484. DOI: 10.1016/j.ympev.2008.12.004
11. Valentin R.E., Fonseca D.M., Gable S., Kyle K.E., Hamilton G.C., Nielsen A.L., Lockwood J.L. Moving eDNA surveys onto land: Strategies for active eDNA aggregation to detect invasive forest insects // Molecular Ecology Resources. – 2020. – № 20(3). – P. 746-755. DOI: 10.1111/1755-0998.13151
12. Wang W., Zhang H., Constant J., Bartlett C., Qin D. Characterization, comparative analysis and phylogenetic implications of mitogenomes of Fulgoridae (Hemiptera: Fulgoromorpha) // Genes. – 2021. – №. 12(8). – P. 1185. DOI: 10.3390/genes12081185
13. Zhang H., Fang W., Zhao X., Jiang X., Stroinski A., Qin D. Comparative Analysis of the Complete Mitochondrial Genomes of Five Species of Ricaniidae (Hemiptera: Fulgoromorpha) and Phylogenetic Implications // Biology. – 2022. – Т. 11. – №. 1. – P. 92. DOI: 10.3390/biology11010092.

Статья поступила в редакцию 01.06.2022 г.

Mironova M.K., Shipulin A.V., Kamayev I.O. Analysis of variability of mitochondrial gene COI and diagnostics of *Lycorma delicatula* (White, 1845) (Hemiptera, Fulgoroidea, Fulgoridae) // Bull. of the State Nikita Botan. Gard. – 2022. – № 145. – P. 178-184

Lycorma delicatula is an invasive hemipteran insect species whose harmfulness is observed in the secondary area. The distribution of this species occurs mainly with the preimaginal stages, which are not identified by morphological methods. The use of DNA-barcoding on a fragment of the mitochondrial COI gene for the diagnosis of this species is limited by the lack of an assessment of its intra-specific and inter-specific variability. According to the results of the analysis of the sequences of this molecular marker, *Lycorma delicatula* well differentiates from other species within the family Fulgoridae and the genus *Lycorma* (bootstrap values $\geq 85\%$). The average value of genetic distances according to the Kimura two-parameter model for *Lycorma delicatula* specimens from the primary area was 1.2%, varying in the range of 0-3.8%. *Lycorma delicatula* is characterized by the presence of a threshold between intra-specific and inter-specific variability, which is 5.0%. The results are of practical importance for the phytosanitary laboratories.

Key words: entomology; invasive species; molecular genetics; phytosanitary; DNA-barcoding

УДК 632.51

DOI: 10.36305/0513-1634-2022-145-184-192

ЭФФЕКТИВНОСТЬ БАКОВЫХ СМЕСЕЙ ГЕРБИЦИДОВ В ЗАЩИТЕ ПРИДОРОЖНЫХ ТЕРРИТОРИЙ КРЫМА ОТ АМБРОЗИИ ПОЛЫННОЛИСТНОЙ

Николай Владимирович Цинкевич¹, Светлана Витальевна Дидович²

¹ Южного филиала Федерального государственного бюджетного учреждения
«Всероссийский центр карантина растений» (ФГБУ «ВНИИКР») 295000,
Республика Крым, г. Симферополь, ул. Оленчука, 52

² ФГБУН «Научно-исследовательский институт сельского хозяйства Крыма» 295493,
Республика Крым, г. Симферополь, ул. Киевская, 150
E-mail: ¹duna8888@mail.ru, ²sv-alex.68@mail.ru

В статье приведены результаты применения баковых смесей гербицидов на основе солей глифосата, сульфонилмочевина и биологически-активных веществ в борьбе с *Ambrosia artemisiifolia* L. в придорожных территориях Республики Крым. В лабораторных экспериментах показано, что опрыскивание гербицидами в прегенеративную фазу развития *Ambrosia artemisiifolia* L. увеличивает эффективность баковых смесей до 100% по всем вариантам опыта. В ходе выполнения испытаний разработано 7 вариантов баковых смесей с применением заниженных от рекомендуемых норм расхода препаратов и гербицидной эффективностью применения от 39 до 68%. Выявлено, что обработанные растения амброзии полыннолистной, находившиеся в прегенеративном возрастном состоянии больше подвержены угнетению гербицидами, чем растения в фазе бутонизации – цветения. Рентабельность применения предложенных композиций в сравнении с рекомендуемыми гербицидами и нормами расхода составляет от 104% до 2395%.

Ключевые слова: *Ambrosia artemisiifolia* L.; интегрированная система защиты; гербициды; глифосат; сульфонилмочевина; экологизация; гиббереллиновая кислота; придорожные территории

Введение

Ambrosia artemisiifolia L. (семейство Asteraceae) – инвазивное растение североамериканского происхождения в настоящее время широко распространилось по всему миру в результате хозяйственной деятельности и интенсификации торговых путей в XX в. [18, 19]. Произрастает в рудеральных местообитаниях, заселяя берега рек, прудов, балки, овраги, поймы рек, придорожные территории, железнодорожные пути, территории строек, засоряет посевы пропашных культур и сплошного сева,