

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ НАУК  
ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ  
ЗАЩИТЫ РАСТЕНИЙ  
ООО ИННОВАЦИОННЫЙ ЦЕНТР ЗАЩИТЫ РАСТЕНИЙ

---

ISSN 1815-3682

**ВЕСТНИК  
ЗАЩИТЫ РАСТЕНИЙ**  
*Приложение*

**PLANT PROTECTION NEWS**  
*Supplement*

**ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНЫЕ  
И ВЫСОКОТОЧНЫЕ  
ТЕХНОЛОГИИ И МЕТОДЫ  
ФИТОСАНИТАРНОГО МОНИТОРИНГА**

**Санкт-Петербург - 2009**

## СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ МИКРОСПОРИДИЙ НАСЕКОМЫХ НА ПРИМЕРЕ ЛУГОВОГО МОТЫЛЬКА *PYRAUSTA (=LOXOSTEGE) STICTICALIS L.\**

### Общие сведения

Для многолетней динамики численности лугового мотылька характерны вспышки массового размножения, разделенные длительными периодами депрессии. Исследованиями последних лет показано, что существенное влияние на динамику численности этого насекомого способно оказывать заражение микроспоридами – облигатными внутриклеточными паразитами. Высокий уровень зараженности имаго лугового мотылька микроспоридами коррелирует с низкой численностью бабочек в следующем поколении, а освобождение популяции насекомых от микроспориоза способствует дальнейшему нарастанию численности лугового мотылька в районах, где сложились благоприятные для этого условия\*\* (Токарев и др., 2007; Фролов и др., 2008). В связи с этим совершенствование системы диагностики микроспоридий в природных популяциях лугового мотылька имеет большое значение для повышения точности прогноза численности этого вредителя (Мальш, 2006). В частности, для более детального анализа паразито-хозяйных отношений микроспоридий с насекомыми-хозяевами на популяционном уровне необходимо иметь возможность выявлять микроспориоз на всех этапах заболевания, включая латентный, а также определять видовую принадлежность и уровень родства микроспоридий, заражающих данных вид насекомого в различных частях его ареала.

Для первичной диагностики микроспоридий традиционно используется световая микроскопия, позволяющая выявить заражение по наличию спор – инфекционных стадий паразита, образующихся в массе на конечном этапе заболевания. Применение различных красителей, в том числе флюоресцентных, позволяет получить специфические картины окрашивания спор, подтверждающие их принадлежность микроспоридам (Pedersen, Dwyer, 1993; Ryan et al., 1993; Didier et al., 1995; Ignatius et al., 1997; Heise et al., 1997).

Однако данный подход не позволяет выявить заражение на ранних этапах, так как локализация на препаратах и точная идентификация стадий внутриклеточного развития микроспоридий микроскопическими методами затруднена. Для эффективной и высокопроизводительной диагностики различных патогенов, в том числе микроспоридий, в природных популяциях членистоногих в последнее время все шире применяются методы молекулярно-биологического анализа на основе амплификации и секвенирования ДНК (Klee et al., 2001; Sokolova et al., 2004; Weiss, Vossbrinck, 1999).

### Сбор насекомых и подготовка образцов

Имаго лугового мотылька отлавливают энтомологическим сачком при маршрутных обследованиях или на светоловушку. Насекомых умерщвляют сразу путем замораживания или фиксации этанолом или содержат в лаборатории при стандартных условиях до наступления смерти (Мальш, 2006). Заспиртованные, засу-

\* Токарев Ю.С., Мальш Ю.М., Фролов А.Н. (Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений РАСХН)

\*\* Исследования поддержаны грантами РФФИ №№ 07-04-00269 и 09-04-00619, а также грантом Президента РФ для Т.Ю.С. № МК-3419.2009.4.

шенные или замороженные образцы можно хранить в течение нескольких месяцев до начала анализа. Трупки помещают индивидуально в лунки иммунологического планшета и гомогенизируют пинцетом в 50  $\mu$ л дистиллированной воды. Каплю гомогената объемом 20  $\mu$ л используют для световой микроскопии; оставшуюся часть гомогената помещают в центрифужную пробирку типа «Эппендорф» объемом 1.5 мл и хранят при  $-22^{\circ}\text{C}$ , размораживая непосредственно перед экстракцией ДНК (см. ниже). Во избежание контаминации образцов материалом, содержащим ДНК микроспоридий, металлические инструменты многократного использования следует прожигать на спиртовке.

### **Флюоресцентная микроскопия**

Для световой микроскопии (СМ) гомогенат насекомых используют для приготовления мазков. Свежие мазки просматривают в светлом поле при увеличении  $\times 900$  под масляной иммерсией (МИ). При подозрении на наличие спор микроспоридий препараты фиксируют абсолютным метанолом в течение 5 мин и высушивают, после чего на мазок наносят каплю 5  $\mu\text{M}$  диамидинфенилениндола (ДАФИ) в физрастворе, забуференном фосфатами натрия (рН 7.0), и через 5 мин покрывают покровным стеклом (все процедуры с флюорохромами проводят при затемнении). Препараты просматривают и изображения фотографируют в световом микроскопе, снабженном эпифлюоресцентной приставкой. Применение данного флюорохрома допустимо также в отношении мазков, окрашенных по Романовскому в модификации Гимза. Если такие препараты покрыты слоем иммерсионного масла или канадского бальзама, его следует удалить отмывкой этанолом или кислотом и этанолом, соответственно. ДАФИ интенсивно окрашивает ДНК-содержащий материал, что обеспечивает выявление ядерного аппарата в спорах микроспоридий. Данный ядерный краситель также слабо окрашивает цитоплазму и экзоспору, благодаря чему может быть видна неокрашенная зона эндоспоры. Кроме этого, ДАФИ связывается и с выброшенной полярной трубкой, компонентом инфекционного аппарата спор микроспоридий. Подобная картина характерна для *Nosema*-подобных спор микроспоридий из членистоногих различных видов (Tokarev et al., 2007a, 2007c) и объясняется способностью флюорохрома ДАФИ связываться не только с ДНК, но и с мембранными структурами (Favilla et al., 1993) и белковыми комплексами (Mazzini et al., 1994). Возможность наблюдать дополнительные структуры, характерные для спор микроспоридий, при их неспецифическом окрашивании ДАФИ, можно считать преимуществом данного метода диагностики, особенно при наблюдении одиночных спор микроспоридий, окрашивание диплокариона в которых не всегда бывает достаточно четким (Tokarev et al., 2007a).

### **Экстракция ДНК**

Для выделения ДНК образцы насекомых в пробирках типа «Эппендорф» дополнительно гомогенизируют стерилизованным тefлоновым или пластиковым пестиком в 100  $\mu$ л лизирующего буфера, содержащего 2% цетилтриметиламмоний бромид (ЦТАБ), 1.4 М NaCl, 100 мМ этилендиаминтетраацетата  $\text{Na}_2$ , 100 мМ Трис-Cl (рН 8.0). После гомогенизации, к образцам добавляют по 500  $\mu$ л лизирующего буфера с добавлением 0.2%  $\beta$ -меркаптоэтанола и 10  $\mu$ л протеиназы К. Смесь инкубируют на водяной бане при  $65^{\circ}\text{C}$  в течение 3 часов. Далее ДНК очищают согласно стандартной процедуре фенольно-хлороформной экстракции (Sambrook et

al., 1989), подробно описанной в другом месте в настоящем сборнике (Токарев и др., 2009). Данный метод дает значительно больший выход ДНК по сравнению с альтернативными методами экстракции, такими как лизирование гуанидин изотиацианатом (Maniatis et al., 1982) с последующим осаждением изопропанолом или экстракция с помощью коммерческих наборов для выделения ДНК (позволяющими избежать использования высокотоксичного фенола). Дополнительные меры по разрушению оболочек спор микроспоридий могут включать предварительную обработку жидким азотом или встряхивание со стеклянными шариками, однако это значительно усложняет манипуляции с образцами спор.

#### **Аmplификация и секвенирование рДНК микроспоридий**

Полученный раствор матричной ДНК используют для амплификации с праймерами, универсальными для участков рДНК микроспоридий, перечисленными в табл. 1.

Амплификацию проводят в объеме 10-20  $\mu\text{л}$ , содержащем 5-10  $\mu\text{л}$  раствора матричной ДНК (см. выше), однократный ПЦР буфер; смесь дНТФ, 0,25 мМ; Taq-полимеразу, 0,4 U  $\mu\text{л}^{-1}$ ; прямой и обратный праймер (Евроген, Россия), 0,5-1 пМол каждого. Цикл ПЦР состоит из:

- а) начальной денатурации при 94°C в течение 180 сек;
- б) 30 циклов денатурации 94°C в течение 180 сек, гибридизации при 54°C в течение 30 сек и элонгации при 72°C;
- в) заключительной фазы при 72°C в течение 10 мин.

Длительность элонгации варьирует в зависимости от набора используемых праймеров (см. табл. 1).

Продукты амплификации разделяют в 1%-ном агарозном геле, содержащем 0,5  $\mu\text{г мл}^{-1}$  бромистого этидия, в горизонтальной камере для электрофореза, просматривают и фотографируют на трансиллюминаторе. При наличии окрашенных полос ПЦР-продуктов (амплификатов) их приблизительный размер определяют по маркеру молекулярного веса, который вносят в лунки геля для электрофореза параллельно с образцами ПЦР-продуктов. Амплификаты выделяют из геля с помощью системы GeneClean, предварительно клонируют в векторе рAL-TA и секвенируют с праймерами M13F и M13R или секвенируют напрямую с праймерами, использованными для амплификации, с помощью автоматического секвенатора согласно инструкции изготовителя.

#### **Филогенетический анализ с помощью пакета Phylip**

Вновь полученные нуклеотидные последовательности (сиквенсы) рДНК микроспоридий редактируют в приложении Bioedit (Hall, 1999). Сравнение вновь полученных сиквенсов с таковыми, имеющимися в Генбанке, выполняют с помощью встроенного BLAST-приложения (алгоритм megablast для сиквенсов с высокой степенью гомологии) на сервере NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)). Это приложение выводит перечень видов и показатели области перекрытия и степени гомологии сравниваемых участков ДНК. Сиквенсы рДНК микроспоридий, имеющиеся в Генбанке и показавшие высокую степень гомологии с вновь полученными сиквенсами, импортируют в Bioedit и выравнивают с помощью встроенного алгоритма Clustal W Multiple Alignment (Thompson et al., 1994). Области, содержащие пропуски нуклеотидов (gaps), удаляют вручную в режиме редактирования; финальный файл «infile» сохраняют в формате Phylip 4 и используют в качестве

вводного файла в пакете приложений PHYLIP 3.68 (Felsenstein, 2004). Для филогенетического анализа в данном пакете запускают одно из следующих приложений в зависимости от используемого метода: *dnparars* (метод «максимальной экономии»), *dnaml* (метод «максимального сходства») и *dnadist/neighbor* (метод «присоединения соседей»), в последнем случае требуется переименовывать промежуточный выходной файл «outfile» в «infile». При необходимости построения консенсусных филограмм с применением функции *bootstrap* прежде всего запускают приложение *seqboot*, в котором количество повторностей в множественном наборе данных (multiple data set) можно изменить клавишей R (по умолчанию = 100). Затем, переименовав выходной «outfile» в «infile», запускают одно из вышеуказанных приложений филогенетического анализа, после чего требуется переименовать выходной файл «outtree» в «intree» и запустить приложение *consense*. В этом случае в качестве изменяемого параметра приложения *seqboot*, *dnparars*, *dnaml* и *neighbor* будут запрашивать случайное нечетное число (random seed number); в приложениях *dnaml*, *dnadist*, *dnparars* и *neighbor* потребуется указать количество повторностей последовательным нажатием клавиш M, затем D (последнее не требуется для *neighbor*) и вводом соответствующего числа. Кроме того, приложениям *dnparars* и *dnaml* необходимо указать количество «перемешивания» порядка ввода сиквенсов (number of times to jumble), увеличение которого приводит к значительному затягиванию процесса анализа во времени.

Таблица 1. Праймеры для амплификации рДНК микроспоридий

Обозначение	5'-3' последовательность нуклеотидов	Приблизительная длина продукта*; длительность фазы элонгации в цикле ПЦР	Ссылка
V1f	CACCAGGTTGATTC TGCCTGAC	500 п.н.; 30 сек	Weiss, 1994
530r	CCGCGGCTGCTGGC AC		Ironside et al., 2003
ss1492r	GGTTACCTTGTTAC GACTT	1200 п.н., 90 сек**	Weiss, Vossbrinck, 1999
18f	CACCAGGTTGATTC TGCC	1800 п.н., 120 сек	
ls580r	GGTCCGTGTTTCAA GACGG		

\* - для микроспоридий лугового мотылька фауны Краснодарского края

\*\* - в сочетании с праймером V1f

Полученный выходной «outfile» содержит изображение дерева в текстовом формате с указанием значений *bootstrap* для каждого узла (что отражает количество деревьев, в которых воспроизводится распределение сиквенсов относительно данного узла), а «outtree» - информацию для построения филограммы приложениями *drawgram* и *drawtree*.