

MOLEKULARNA IDENTIFIKACIJA PRAVIH LISTNIH UŠI (Sternorrhyncha: Aphidoidea) NA PODLAGI NUKLEOTIDNE ANALIZE REGIJE CITOKROM OKSIDAZA I

Peter KOZMUS¹, Špela MODIC²

^{1,2}Kmetijski inštitut Slovenije, Oddelek za varstvo rastlin, Ljubljana

IZVLEČEK

V prispevku opisujemo molekularno metodo identifikacije pravih listnih uši. V analizo smo vključili 55 vzorcev pravih listnih uši. Pri identifikaciji smo se osredotočili na 708 bp dolgo regijo gena za citokrom oksidazo I (COI) v mitohondrijski DNK. Za identifikacijo smo uporabili metodo sekvenciranja. Identificirali smo 39 vzorcev listnih uši, iz 15-tih rodov družine Aphididae. Skupno smo molekularno določili 19 različnih vrst listnih uši. Ugotovili smo relativno visoko stopnjo polimorfizma med vrstami (3 - 13%), znotraj vrst pa je bila vrednost manjša (0 - 1.5%). Z analizo smo potrdili, da je regija COI primerna za razločevanje pogostejših vrst listnih uši.

Ključne besede: citokrom oksidaza I, genetika, listne uši, molekularna identifikacija

ABSTRACT

MOLECULAR IDENTIFICATION OF APHIDS (Sternorrhyncha: Aphidoidea) BASED ON NUCLEOTIDE ANALYZES OF CYTOCHROME OXIDASE I REGION

In the current article we describe the molecular method used for aphid identification. 55 samples of aphids were included in the analysis in which we focused on 708 bp long fragment of cytochrome oxidase I (COI) in the mitochondrial DNA. For species identification we used sequence analysis. We identified 39 samples of aphids from 15 races of the family Aphididae. A total of 19 different aphid species were identified genetically. Between species the level of polymorphism was 3-13 percent, within species it was 0-1.5. With the analysis we have confirmed that the COI region was suitable for genetic identification of the most widely spread aphids.

Key words: cytochrome oxidase I, genetics, aphids, molecular identification

1 UVOD

Listne uši (naddružina Aphidoidea) so drobne, fitofagne vrste žuželk, ki prevladujejo v severnem zmernem podnebnem pasu. Na svetu je znanih več kot 4700 vrst listnih uši (Remaudiere in Remaudiere, 1997), v Evropi pa približno 1500 vrst (Petrović-Obradović, 2003), od teh jih živi v Sloveniji 197 vrst (Modic in Urek, 2008). Ker so listne uši majhne žuželke, njihov napad pogosto opazimo šele po poškodbah na rastlinah. Povzročajo posredno in neposredno škodo. Neposredno škodo rastlinam povzročajo z izsesavanjem sokov iz njihovih različnih delov in s tem povzročajo različne kodravosti, bulavosti, razbarvanja, zvijanja listov in poganjkov, izrastke ter deformacije cele ali le posameznega dela rastline. Posredno škodo povzročajo s prenosom številnih virusov (Blackman in Eastoup, 2002), ker se

¹ dr., Hacqutova 17, SI-1000 Ljubljana, e-mail: peter.kozmus@kis.si

² mag., univ. dipl. inž. agr., prav tam

v svojem letnem ciklu selijo iz prvotnih na drugotne gostitelje in s hranjenjem na gostitelju, ki je okužen postanejo prenašalke različnih rastlinskih virusov ter so zato lahko nevarne gojenim rastlinam.

Mnoge gospodarsko pomembne vrste uši je morfološko zelo težko ločevati od sorodnih, manj škodljivih predstavnikov, ker je zanje značilen izrazit polimorfizem znotraj vrst in polifenizem. Poleg tega identifikacija včasih temelji na težko opaznih znakih (Cenis in sod., 1993; Turak in Hales, 1994). Še težavnejše je določevanje nižjih razvojnih stadijev listnih uši, za katere ni primernih določevalnih ključev. Natančna identifikacija je gospodarskega pomena še zlasti v intenzivni pridelavi zelenjave, sadja, okrasnih in drugih rastlin, ter ob najdbah neznanih potencialno škodljivih vrst listnih uši.

Molekularni pristop, kakršen je PCR (Polymerase Chain Reaction – verižna reakcija s polimerazo) je pogosto uporabljen pri identifikaciji težje določljivih organizmov. Pristop je uspešno vpeljan pri določevanju nekaterih skupin vrst nevretenčarjev in pri določevanju vrst na podlagi analize jajčec ali drugih nerazvitih oblik (Clark in sod., 2001; Carew in sod., 2003, 2005; Hebert in sod., 2004). Pristop je posebej uporaben v primerih, ko so morfološka in ekološka opazovanja nezadostna ter pri programih monitoringa, kjer ima hitrost identifikacije in natančnost poseben pomen.

V preteklem obdobju je bilo za potrebe določevanja vrst preučevanih več regij v genomu sorodnih vrst. Glavni namen je bil najti najprimernejšo regijo, na podlagi katere bi bilo določevanje osebkov zanesljivo. Jedrna rRNA, mitohondrijski citokrom b, citokrom oksidaza I ter II, so regije, ki so bile predlagane za standardne, za določevanje vrst osebkov in preučevanje njihove sorodnosti (Hebert in sod., 2003a, b; Tautz in sod., 2003). Končna izbira regije je odvisna od vrste preučevanih organizmov.

Prve genetske študije na ušeh so bile narejene na podlagi naključnega PCR-ja. S to metodo je mogoče določiti večje razlike med vrstami in znotraj njih (Black in sod., 1992; Cenis in sod., 1993). Uporabljen je bil tudi PCR-RFLP pristop (restriction fragment length polymorphism; Valenzuela in sod., 2007). Danes je v molekularni genetiki bolj razširjena sekvenčna analiza, s katero ugotavljamo zaporedje nukleotidov na določenem odseku. S tem pristopom je mogoče določiti tako odrasle osebkove kot tudi druge nižje razvojne stadije nevretenčarjev (Loxdale in Lushai, 1998).

V naši študiji smo analizirali najpogostejše vrste listnih uši, ki se pojavljajo predvsem na ječmenu, pšenici, krompirju in koruzi. V analizi smo skupaj analizirali 55 vzorcev uši. Preučevali smo 708 bp dolg odsek (gen za Citokrom oksidazo I) v mitohondrijski DNK. Z analizo smo želeli ugotoviti ali je regija ustrezna za določevanje vrst listnih uši in če se rezultati ujema z že objavljenimi. Zanimalo nas je tudi, če je komercialni kit, namenjen za izolacijo molekule DNK iz živalskih tkiv, ustrezen za izolacijo molekule DNK iz posameznega vzorca uši.

2 MATERIAL IN METODE

2.1 Zbiranje uši

Uši smo zbrali v letu 2008. Nabirali smo jih ročno iz različnih delov rastlin (cvetovi, listi, stebela). Uši so bile najprej morfološko identificirane, na podlagi morfoloških ključev (Blackman 1974; Blackman in Eastop 1985, Blackman in Eastop 1994, Taylor 1984.). Nato smo vzorce do začetka molekularnih analiz shranili v zamrzovalnik na -80 °C. Vsak osebek je bil shranjen v svoji epici, le v primerih, da so bili osebki iz iste kolonije, so bili le ti shranjeni v isti epici. Natančnejši podatki o nabranih vzorcih listnih uši so prikazani v preglednici 1.

Preglednica 1: Podatki o nabranih vzorcih listnih uši, ki smo jih uporabili v molekularni analizi.
Table 1: Data about collected aphids, which were included in the molecular analysis

Datum nabiranja	mesto nabiranja	gostiteljska rastlina	št. analiziranih osebkov
7. 5.	Ljubljana	<i>Ribes aciculare</i>	1
8. 5.	Ljubljana	<i>Pyrus malus</i>	3
8. 5.	Libeliče	<i>Solanum tuberosum</i>	1
8. 5.	Sežana	<i>Lactuca sativa</i>	1
8. 5.	Sežana	<i>Pyrus malus</i>	1
8. 5.	Ravnje (KRAS)	<i>Prunus</i>	1
9. 5.	Libeliče	<i>Solanum tuberosum</i>	4
14. 5.	Ljubljana	<i>Prunus avium</i>	1
14. 5.	Cerknica	<i>Fragaria vesca</i>	1
14. 5.	Vrtojba	<i>Amaranthus caudatus</i>	1
19. 5.	Stična	<i>Solanum tuberosum</i>	1
22. 5.	Seča	<i>Cynara scolymus</i>	1
23. 5.	Brdo pri Lukovici	<i>Fragaria vesca</i>	1
23. 5.	Brdo pri Lukovici	<i>Fragaria vesca</i>	1
29. 5.	Libeliče	<i>Solanum tuberosum</i>	3
30. 5.	Mengeš	<i>Triticum aestivum</i>	3
2. 6.	Libeliče	<i>Solanum tuberosum</i>	1
3. 6.	Libeliče	<i>Solanum tuberosum</i>	1
4. 6.	Libeliče	<i>Solanum tuberosum</i>	1
5. 6.	Stična	<i>Solanum tuberosum</i>	1
6. 6.	Stična	<i>Solanum tuberosum</i>	1
7. 6.	Stična	<i>Solanum tuberosum</i>	1
9. 6.	Libeliče	<i>Solanum tuberosum</i>	1
10. 6.	Mengeš	<i>Hordeum sativum</i>	1
10. 6.	Ljubljana	<i>Pyrus malus</i>	1
14. 6.	Stična	<i>Solanum tuberosum</i>	1
16. 5.	Mengeš	<i>Triticum aestivum</i>	1
16. 5.	Šentvid pri stični	<i>Solanum tuberosum</i>	1
16. 6.	Ljubljana	<i>Zea mays</i>	6
16. 6.	Ljubljana	<i>Zea mays</i>	3
16. 6.	Ljubljana	<i>Cydonia vulgaris</i>	1
20. 6.	Kum	<i>Pyrus</i>	1
19. 6.	Sladki vrh	<i>Beta vulgaris</i>	1
20. 6.	Mengeš	<i>Hordeum sativum</i>	1
23. 6.	Žalec	<i>Pyrus malus</i>	1
23. 6.	Žalec	<i>Cydonia vulgaris</i>	1
10. 10.	Mozirski gaj	<i>Euphorbion</i>	1
11. 11.	Ljubljana	<i>Myosotis sp.</i>	1
28. 11.	Krško	<i>Pyrus malus</i>	1

2.2 DNA izolacija in PCR reakcija

Celotna DNK je bila iz vseh listnih uši izolirana z JETQUICH Tissue DNK Spin kit (Genomed, Nemčija) po nekoliko spremenjenem postopku, kot je opisan za izolacijo DNK iz mišjih repkov. Pridobljeno molekulo DNK smo do začetka analiz hranili v hladilniku. Z verižno reakcijo s polimerazo smo namnožili regijo, ki kodira gen za citokrom oksidazno podenoto I (COI) v mitohondrijski DNK. Uporabili smo začetna oligonukleotida LCO1490 in HCO2198

(Valenzula in sod., 2007). Amplifikacijske reakcije so potekale v 30 μ l reakcijskih mešanicah. PCR mešanica je vsebovala 2 μ L izolirane DNK, 10 μ M vsakega oligonukleotida, 1x pufer (10 mM Tris-HCl, 10 mM KCl), 1,5 mM MgCl₂, 1 mmol vsakega dNTP, 1 enota polimeraze (BIOTOOLS) ter vodo do končnega volumna.

PCR reakcija je potekala v cikličnem termostatu GeneAmp PCR System 9700 (PE Applied Biosystems) s sledečim temperaturnim profilom: 3 min na 94 °C, 40 ciklov s profilom: 45 s 94 °C, 30 s na 50 °C, 1 min 72 °C. Sinteza se je končala s 5 min na 72 °C. Uspešnost namnožitve regije smo preverjali tako, da smo 5 μ L produkta naložili na 1,5% agarozni gel, ki je vseboval etidijev bromid. Elektroforeza je tekla pri sobni temperaturi pod napetostjo 20-25 mA in 100-120 V. Po 30 minutah smo namnožene fragmente DNK opazovali pod transluminatorjem pri valovni dolžini 302 nm in ocenili dolžino fragmentov. Produkte z uspešno namnoženim odsekom smo sekvencirali.

2.3 Sekvenčna analiza DNK in obdelava rezultatov

Za postopek sekvenciranja smo uporabili oba primerja, tako da smo za vsak vzorec dobili dve nukleotidni zaporedji. Dobljeni zaporedji smo najprej pregledali in uredili s programom CHROMAS (ver. 1.41). V nadaljevanju smo nukleotidna zaporedja uvozili v program BioEdit (ver.: 7.0.5.3; Hall, 1999). Zaporedja smo poravnali s programom ClustalW (Thomson in sod., 1994) in jih najprej primerjali znotraj iste vrste, nato pa še med vrstami. Nazadnje smo urejena nukleotidna zaporedja, za posamezne vrste, primerjali z zaporedji, ki so naložene v elektronski banki GenBank na strani National Center of Biotechnology Information (NCBI) internetni naslov: (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>).

Za iskanje podobnih nukleotidnih zaporedij v bazah podatkov GenBank, smo uporabili program BLAST (Basis Local Alignment Tool), ki se nahaja na internetnem naslovu <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>. Pri vsakem rezultatu smo bili pozorni na procent ujemanja sekvenc znotraj vrste in tudi na procent ujemanja med najbolj sorodnimi vrstami.

3 REZULTATI IN RAZPRAVA

3.1 Rezultati

Z molekularno analizo smo identificirali 39 osebkov, ki so pripadali 19-tim različnim vrstami (Preglednica 2). Za ostalih 16 vzorcev uši vrste nismo mogli molekularno določiti, ker nukleotidnih zaporedij za te vrste v bazah podatkov še ni. Analizirane vrste so bile iz 15 rodov. Znotraj vrst smo ugotovili, da je polimorfizem manjši od 1.5%, med vrstami pa je bila vrednost polimorfizma med 3 in 13%.

Za vsak vzorec smo v bazah našli večje število nukleotidnih zaporedij, od katerih smo pregledali le tiste, ki so se najbolj skladale z našimi. V glavnem so bila ta zaporedja od istih in najbolj sorodnih vrst. V nekaterih primerih so se najdene sekvence, za isto vrsto uši, popolnoma skladale z našimi sekvencami, v nekaterih primerih, pa so se nukleotidna zaporedja razlikovala.

3.2 Razprava

Na podlagi dobljenih rezultatov potrjujemo, da je mogoče z uporabljenim kitom izolirati molekulo DNK iz posameznega vzorca uši in da je le ta ustrezna za nadaljnje molekularne analize. Potrdili smo tudi, da je regija COI dovolj variabilna in primerna za identifikacijo listnih uši. Z analizo smo ugotovili relativno visoko stopnjo polimorfizma med vrstami, znotraj vrst pa je bila vrednost manjša, vendar še vseeno razmeroma visoka. Z molekularno analizo smo potrdili 19 vrst. Ugotovili smo, da je regija COI primerna za razločevanje najpogostejših vrst listnih uši, za ostale manj pogoste in manj preiskovane vrste pa v

elektronski bazi nukleotidnih zaporedij še ni vnosov, zato pri teh vrstah molekularna identifikacija še ni mogoča. Zaradi tega, kot temeljna metoda določevanja ostaja morfološka identifikacija, tudi zaradi dejstva, da je molekularna identifikacija relativno draga. Molekularna identifikacija je ustrezna v primerih, ko potrebujemo potrditev morfološke identifikacije pogostejših vrst listnih uši, z morfološkimi identifikacijskimi ključi pa te osebke zaradi različnih vzrokov ni mogoče identificirati.

Preglednica 2: Molekularno identificirani vzorci listnih uši
Table 2: Molecular identified samples of aphids

datum	mesto nabiranja	gostiteljska rastlina	vrsta	št. osebkov
16.5.	Šentvid pri stični	<i>Solanum tuberosum</i>	<i>Acyrtosiphon pisum</i>	1
29.5.	Libeliče	<i>Solanum tuberosum</i>	<i>Adelges laricis</i>	2
14.5.	Vrtojba	<i>Amaranthus caudatus</i>	<i>Aphis fabae</i>	1
22.5.	Seča	<i>Cynara scolymus</i>	<i>Aphis fabae</i>	1
16.6.	Ljubljana	<i>Zea mays</i>	<i>Aphis fabae</i>	2
19.6.	Sladki vrh	<i>Beta vulgaris</i>	<i>Aphis fabae</i>	1
23.5.	Brdo pri Lukovici	<i>Fragaria vesca</i>	<i>Aphis glycines*</i>	1
16.6.	Ljubljana	<i>Zea mays</i>	<i>Aphis gossypii</i>	1
2.6.	Libeliče	<i>Solanum tuberosum</i>	<i>Aphis gossypii</i>	1
10.10.	Mozirski gaj	<i>Euphorbia</i>	<i>Aphis nerii</i>	1
10.6.	Ljubljana	<i>Pyrus malus</i>	<i>Aphis spiraecola</i>	1
16.6.	Ljubljana	<i>Cydonia vulgaris</i>	<i>Aphis spiraecola</i>	1
23.6.	Žalec	<i>Pyrus malus</i>	<i>Aphis spiraecola</i>	1
11.11.	Ljubljana	<i>Myosotis</i> sp.	<i>Aulacorthum solani</i>	1
8.5.	Ravnje (KRAS)	<i>Prunus</i>	<i>Brachycaudus helichrysi</i>	1
9.5.	Libeliče	<i>Solanum tuberosum</i>	<i>Brachycaudus helichrysi</i>	1
9.5.	Libeliče	<i>Solanum tuberosum</i>	<i>Cavariella theobaldi</i>	1
14.5.	Cerknica	<i>Fragaria vesca</i>	<i>Chaetosiphon fragaefolii</i>	1
7.5.	Ljubljana	<i>Ribes aciculare</i>	<i>Cryptomyzus ribis</i>	1
8.5.	Sežana	<i>Pyrus malus</i>	<i>Dysaphis plantaginea</i>	1
8.5.	Ljubljana	<i>Pyrus malus</i>	<i>Dysaphis plantaginea</i>	1
16.6.	Ljubljana	<i>Zea mays</i>	<i>Ephedrus plagiator*</i>	1
8.5.	Ljubljana	<i>Pyrus malus</i>	<i>Eriosoma lanigerum</i>	2
6.6.	Libeliče	<i>Solanum tuberosum</i>	<i>Macrosiphoniella leucanthemi</i>	1
14.5.	Ljubljana	<i>Prunus avium</i>	<i>Myzus cerasi</i>	1
14.6.	Stična	<i>Solanum tuberosum</i>	<i>Myzus cerasi</i>	1
8.5.	Sežana	<i>Lactuca sativa</i> L.	<i>Nasonovia ribisnigri</i>	1
8.5.	Libeliče	<i>Solanum tuberosum</i>	<i>Nasonovia ribisnigri</i>	1
16.6.	Ljubljana	<i>Zea mays</i>	<i>Rhopalosiphum maidis</i>	2
16.6.	Ljubljana	<i>Zea mays</i>	<i>Rhopalosiphum padi</i>	1
20.6.	Mengeš	<i>Hordeum sativum</i>	<i>Rhopalosiphum padi</i>	1
16.5.	Mengeš	<i>Triticum aestivum</i>	<i>Sitobion avenae</i>	1
30.5.	Mengeš	<i>Triticum aestivum</i>	<i>Sitobion avenae</i>	3
10.6.	Mengeš	<i>Hordeum sativum</i>	<i>Sitobion avenae</i>	1
16.6.	Ljubljana	<i>Zea mays</i>	<i>Sitobion avenae</i>	1

* parazitoid iz družine Braconidae

4 SKLEPI

Komercialni kit JETQUICH Tissue DNK Spin kit (Genomed, Nemčija) je ustrezen za izolacijo molekule DNK iz posamezne listne uši. Regija COI je ustrežna za razločevanje pogostejših vrst listnih uši. Ostale vrste listnih uši bo mogoče molekularno identificirati, ko bodo v baze podatkov vnesena tudi nukleotidna zaporedja teh vrst uši.

5 LITERATURA

- Blackman R. 1974. Aphids. Great Britain by Tinling. 175.
- Blackman R.L., Eastop V.F. 1994. Aphids on the world's trees.. University Press, Cambridge, US. 987.
- Blackman R.L., Eastop, V.F. 1985. Aphids on the world's crops. An identification guide. The Bath Press, Avon. 466.
- Black W. C., DuTeau N. M., Puterka G. J., Nechols J. R., Pettorini J. M. 1992. Use of the random amplified polymorphis DNA polymerase chain reaction (RAPD-PCR) to detect DNA polymorphism in aphids (HOMOPTERA: Aphididae). Bulletin of entomological research 82, 151-159
- Blackman R. L., Eastop V. F. 2000. Aphids on the World's Crops: An identification and information guide, 2en edition. John Wiley and Sons Ltd, Chichester, Anglija
- Carew M. E., Pettigrove V., Hoffmann A. A. 2003. Identifying chironomids (Diptera: Chironomidae) for biological monitoring with PCR-RFLP. Bulletin of Entomological research 93, 482-490
- Carew M. E., Pettigrove V., Hoffmann A. A. 2005. The utility od DNA markers in classical taxonomy: Cytochrome Oxidase I markers to differentiate Australian Cladopelma (Diptera: Chironomidae) midges. Annals of the entomological society of America 98, 587-594
- Cenis J. L., Perez P., Fereres A., 1993. Identification of aphid (Homoptera: Aphididae) species and clones by random amplified polymorphic DNA. Annals Entomology Society of America 86, 545-550.
- Clark T. L., Meinke L. J., Foster J. E. 2001. PCR Rflp of the mitochondrial cytochrome oxidase (subunit I) gene provides diagnostic marker for selected *Diabrotica* species (Coleoptera: Chrysomelidae) Bulletin of Entomological research 91, 419-427
- Hall, T.A. 1999. BioEdit:A-user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucl. Acids. Symp. Ser. 41:95-98.
- Hebert P. D. N., Cywinska A., Ball S. L., deWaard J. R. 2003a. Biological identification through DNA barcodes. Proceedings of the royal society of London b. 270, 313- 321.
- Hebert P. D. N., Ratnasingham S., deWaard J. R. 2003b. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit I divergences among closely related species. Proceedings of the royal society of London B. 270, S96-S99.
- Hebert P. D. N., Penton E. H., Burns J. M., Janzen D. H., Hallwachs W. 2004. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the Neotropical skipper butterfly *Astrartes fulgerator*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 101, 14812-14817.
- Loxdale, H.D., Lushai, G. 1998. Molecular markers in entomology (Review). Bulletin of Entomological Research 88, 577 - 600.
- Modic Š., Urek G. 2008. Prispevek k poznavanju favne listnih uši (Sternorrhyncha: Aphidoidea) Slovenije. Acta Entomologica Slovenica, 16, 1: 87 - 97.
- Petrović-Obradović, O. 2003: Biljne vaši (Homoptera: Aphididae) Srbije. Poljoprivredni fakultet Univerziteta u Beogradu. 153 str.
- Remaudiere, G., Remaudiere, M. 1997: Catalogue of the World's Aphididae. INRA Editions, Paris. 473 str.
- Tautz D., Arctander P., Minelli A., Thomas R. H., Volger A. P. 2003. A plea dor dna taxonomy. Trends in ecology and evolution 18, 70-74.
- Taylor L.R. 1984. A handbook for aphid identification manuel d'identification des pucerons. C.E.C., D.G., VI Dir. F - Div. 4. Integrated and biological control programe. 171.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G. and Gibson, T.J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Research, submitted, June 1994.
- Turak E., Hales D. F., 1994. An allozyme method for identifying individual aphids of morphologically similar taxa (Hemiptera: Aphididae). Journal of the Australian entomological society 33, 57-59
- Valenzula I., Hoffmann A.A., Malipatil M. B., Ridland P. M., Weeks A. R. 2007. Identification of aphid species (Hemiptera: Aphididae: Aphidinae) using a rapid polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism method based on the cytochrome oxidase subunit I gene. Australian journal of entomology, 46: 305-312