

О.П. БЕРЕЗОВСКАЯ¹, О.В. ПОДОЛИЧ²,
А.П. СИДОРЕНКО²

¹ Институт зоологии им.И.И.Шмальгаузена НАН Украины, Киев,
e-mail: berezovska_o@yahoo.com

² Институт агроэкологии и биотехнологии УААН, Киев
e-mail: siap_ny@hotmail.com

ХАРАКТЕРИСТИКА ВНУТРИПОПУЛЯЦИОННОГО ГЕНЕТИЧЕСКОГО ПОЛИМОРФИЗМА КОЛОРАДСКОГО ЖУКА ПО ISSR-МАРКЕРАМ И ФЕНОФОРМАМ



Проведена сравнительная оценка уровня генетического полиморфизма в локальной популяции колорадского жука по ISSR-маркерам и вариантам рисунка переднеспинки имаго. В отличие от ISSR-маркеров, по которым уровень разнообразия остается примерно на одном уровне в течение летнего сезона, полиморфизм исследованной популяции колорадского жука по фенотипам в этот же период значительно снижается, свидетельствуя об адаптивности фенотипов. Полученные данные выявляют также различия в уровне генетического разнообразия среди самок и самцов.

© О.П. БЕРЕЗОВСКАЯ, О.В. ПОДОЛИЧ,
А.П. СИДОРЕНКО, 2003

ISSN 0564-3783. Цитология и генетика. 2003. № 2

Введение. Генетический полиморфизм колорадского жука, являющийся основой широкой экологической пластичности вида [1], стал предметом пристального внимания в последнее время в связи с активной экспансией насекомого-вредителя. Для совершенствования систем защиты растений и контроля за численностью вредителя необходимы достоверные методы оценки состояния природных популяций жука.

При анализе структуры популяций колорадского жука чаще всего используется вариативность морфологических признаков (рисунок переднеспинки и надкрылий имаго, цвет яиц и личинок) [1–5], для которых показана наиболее четко выраженная генетически детерминированная природа. Наиболее простым, доступным и получившим широкое распространение методом является анализ рисунка переднеспинки имаго как совокупности фенотипов с выделением девяти четко различимых вариантов [5]. Он позволяет стандартизировать все многообразие форм рисунка и количественно оценить вариативность по этому набору признаков. Делаются также попытки связать варианты рисунка переднеспинки имаго с засухоустойчивостью, пищевыми предпочтениями [5] и устойчивостью к действию инсектицидов [6].

Разработанные в последние годы молекулярно-генетические методы дают возможность оценить уровень генетического полиморфизма особей, анализируя непосредственно геномные последовательности ДНК. При анализе популяций особого внимания заслуживают методы, позволяющие тестировать одновременно большое количество полиморфных локусов и, таким образом, давать комплексную характеристику геномов. Микросателлиты — короткие повторяющиеся последовательности, встречающиеся по всему геному — подходящий инструмент для такого рода исследований. Используемые как праймеры в полимеразной цепной реакции, они направляют амплификацию участков между близко расположенными противоположно ориентированными микросателлитными последовательностями, давая, как правило, доминантные маркеры. Техника ISSR-PCR (Inter Simple Sequence Repeats — Polymerase Chain Reaction), описанная впервые Zietkewicz [7], позволила значительно увеличить количество высоковариативных генетических маркеров, которые могут быть применены для популяционных исследований. Наиболее широко ISSR-маркеры используют в популяцион-

ной генетике растений, и только в нескольких работах они были применены к анализу популяций насекомых: *Bombyx mori* [8], *Aedes aegypti* и двух видов *Hemiptera* — *Acyrtosiphon pisum* и *Pemphigus obesinymphae* [9].

Ранее нами с помощью RAPD-маркеров был показан высокий уровень генетического полиморфизма и выявлена сложная структура локальных популяций колорадского жука [10, 11]. Поскольку ISSR-маркеры обладают высокой внутривидовой вариабельностью, сравнимой с уровнем вариабельности по RAPD-маркерам, и в то же время более воспроизводимы, они были выбраны нами для оценки уровня генетического полиморфизма в локальной природной популяции колорадского жука и его динамики в течение одного летнего сезона. Задача, которую мы ставили перед собой в настоящей работе — сравнение оценок уровня полиморфизма локальной популяции колорадского жука, полученных молекулярно-генетическим и фенетическим методами.

Материал и методы. Имаго колорадского жука собирали на участке в Фастовском районе Киевской области в течение летнего сезона 2000 г.

Для анализа генетического полиморфизма по ISSR-маркерам из каждой выборки было взято по 6 самцов и 6 самок. Пол насекомых определяли по морфологическим признакам [12]. Экстракцию ДНК осуществляли по стандартной методике, описанной ранее [10].

Амплификацию проводили в реакционной смеси объемом 20 мкл на приборе Primus 25

(MWG — Biotech, Германия) с использованием набора реактивов для полимеразной цепной реакции GenePak™ PCR Universal (Изоген, Москва). Было отобрано и использовано два информативных микросателлитных праймера: П1 — (GTG)₇A и П5 — (AG)₉C.

Режим ПЦР: денатурация при 95 °C — 5 мин, далее 35 циклов — денатурация при 94 °C в течение 1 мин, отжиг при 56 °C — 1,5 мин, синтез при 72 °C — 2 мин. Терминальную стадию синтеза проводили в течение 10 мин. Амплифицированные фрагменты ДНК разделяли электрофорезом в 1,6%-ном агарозном геле. В качестве маркера использовали ДНК фага λ, рестрицированную Pst I.

Наличие продукта амплификации в идентичных положениях определяли визуально на окрашенных бромистым этидием гелях без учета интенсивности окрашивания полосы. Очень слабые полосы не учитывали при анализе. По результатам электрофоретического разделения амплифицированных фрагментов была составлена матрица ISSR-фенотипов, где отмечено присутствие (1) или отсутствие (0) соответствующего продукта амплификации.

Фенотипическую структуру популяции анализировали по соотношению частоты встречаемости девяти форм рисунка центральной части переднеспинки имаго колорадского жука [5]. Всего были проанализированы 162 особи.

Для сравнения результатов оценки полиморфизма, полученных двумя методами, использо-

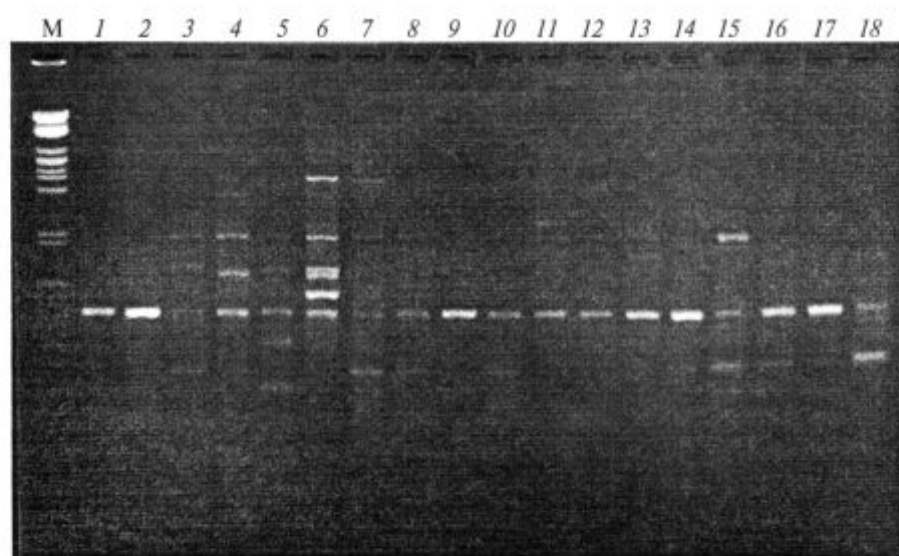


Рис. 1. Индивидуальные спектры продуктов амплификации ДНК самок колорадского жука с праймером (GTG)₇A: 1–6 — июнь; 7–12 — июль; 13–18 — август; М — ДНК фага λ, рестрицированная Pst I

вали показатель Шеннона [13], вычисленный по формуле

$$R = H/H_0$$

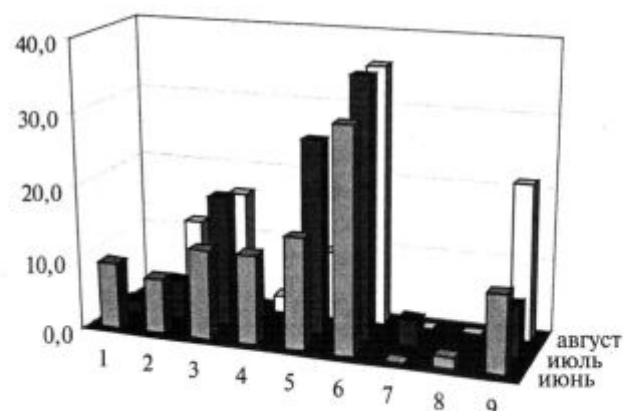
где $H_0 = -\ln p_n$, n — количество фенотипов по выделенным признакам; $H = -\sum p_i \ln p_i$ — частоты фенотипов в выборке.

Оценка процента несовпадающих электрофоретических полос в ISSR-характеристиках при попарных сравнениях и кластерный анализ методом UPGMA проведены с использованием интегрированного пакета для статистического анализа Statistica 5.5A.

Результаты исследований. Для оценки уровня генетического полиморфизма природной популяции колорадского жука по ISSR-маркерам было использовано два праймера, которые позволили получить в совокупности 29 маркеров. Праймер (GTG)₇A направлял амплификацию 18 маркерных фрагментов, (AG)₉C — 11 (рис. 1). Набор этих маркеров специфически характеризовал каждую особь.

Частота встречаемости отдельных ISSR-маркеров среди жуков изучаемой популяции варьировала от 2 до 94 % (табл. 1). Маркеры П1.2700, П1.2000, П1.1700, П1.1400, П1.920 и П1.720, присутствовавшие в июне и июле, в августе практически исчезли. Количество особей, имеющих маркеры П.1.1160, П.1.900 и П5.750, к августу значительно снизилось, в то же время появились особи с новыми маркерами в положениях П1.970, П5.1400, П5.1250, П5.1100 и П5.600. Частота встречаемости других ISSR-маркеров существенно не изменилась (П1.1250, П1.1100, П1.850, П1.670).

Частоты проявления ISSR-маркеров у самок и самцов коррелировали на протяжении всех трех летних месяцев ($r = 0,9$), в то же время сум-



Признаки (фены)	Пятна слиты	Несимметричный рисунок	Пятна отделены
Точка ярко выражена	 ФОРМА 1	 ФОРМА 2	 ФОРМА 3
Точка слабо выражена	 ФОРМА 4	 ФОРМА 5	 ФОРМА 6
Точки нет	 ФОРМА 7	 ФОРМА 8	 ФОРМА 9

Рис. 2. Динамика частот встречаемости фенотипов колорадского жука (суммарно самцов и самок) в локальной популяции Киевской области. Нумерация столбцов соответствует номерам форм рисунка переднегрудки имаго, показанным в таблице (по Фасулати [5])

Таблица 1
Частота встречаемости отдельных ISSR-маркеров в популяции колорадского жука по месяцам, %

Маркер	Июнь	Июль	Август	Маркер	Июнь	Июль	Август	Маркер	Июнь	Июль	Август
П1.2700	0	8,3	0	П1.900	33,3	33,3	16,7	П5.1400	0	0	8,3
П1.2000	25,0	33,3	0	П1.850	25,0	16,7	16,7	П5.1250	0	0	33,3
П1.1700	8,3	25,0	0	П1.720	25,0	8,3	0	П5.1200	41,67	66,7	41,7
П1.1400	25,0	8,3	0	П1.670	91,7	100	91,7	П5.1160	75,0	25,0	66,7
П1.1250	25,0	25,0	33,3	П1.650	16,7	0	25,0	П5.1100	0	0	8,3
П1.1160	50	58,3	16,7	П1.520	8,3	0	16,7	П5.900	16,7	25	16,7
П1.1100	16,7	16,7	16,7	П1.400	16,7	58,3	66,7	П5.800	50,0	100	66,7
П1.970	0	0	16,7	П1.350	8,3	8,3	16,7	П5.750	25,0	25,0	8,3
П1.950	33,3	8,3	41,7	П5.1800	0	8,3	0	П5.600	0	0	25,0
П1.920	16,7	8,3	0	П5.1700	0	8,3	25,0				

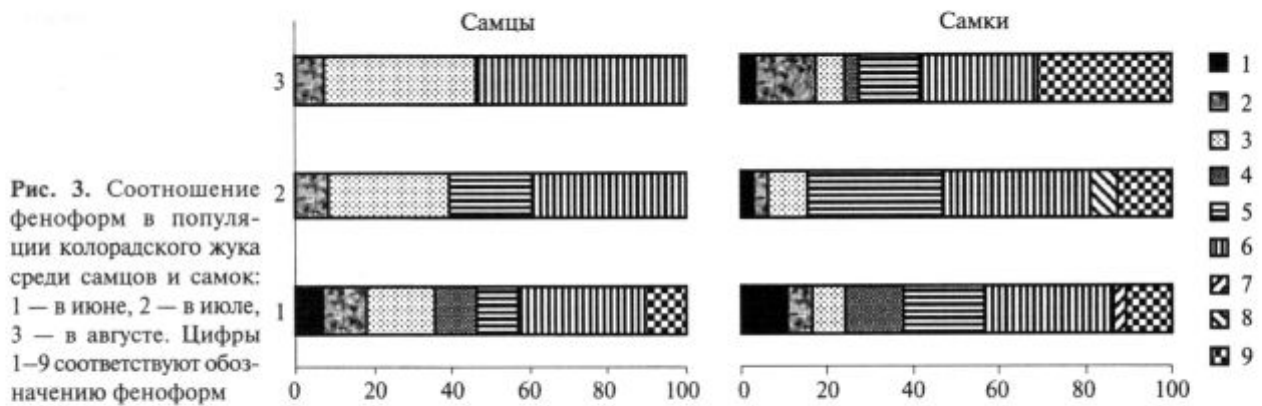


Рис. 3. Соотношение феноформ в популяции колорадского жука среди самцов и самок: 1 — в июне, 2 — в июле, 3 — в августе. Цифры 1–9 соответствуют обозначению феноформ

марное количество выявляемых ISSR-маркеров у самок было достоверно выше, чем у самцов при оценке по непараметрическому критерию попарных сравнений Вилкоксона ($p = 0,0001$).

В тестируемой популяции у имаго преобладал рисунок переднеспинки, соответствующий феноформе 6 (рис. 2). Относительное количество жуков этой феноформы возросло в июле и сохранилось на этом уровне в августе, а феноформы 2, 4 и 9 снижалось в середине сезона и затем возрастало. Количество жуков феноформы 1 имело тенденцию к снижению, а 3 — к возрастанию. Жуки с вариантами рисунка 7 и 8 были немногочисленны, и вариации в их количестве невелики.

Частоты отдельных феноформ у самок и самцов различались. У самцов на протяжении всего сезона доминировали феноформы 3 и 6, тогда как у самок рисунок переднеспинки в целом был более вариателен, и в разные сроки в той или иной степени преобладали феноформы 5, 6 и 9 (рис. 3). Минорные фенотипы также, как правило, принадлежали самкам.

Сопоставление результатов оценки полиморфизма, полученных путем анализа ISSR-спектров и феноформ рисунка переднеспинки имаго, проводили с помощью показателя разнообразия Шеннона. Результаты сравнения с учетом пола жуков представлены в табл. 2.

Оценки генетического разнообразия (суммарно для самцов и самок), полученные двумя методами, имеют различную динамику в течение летнего сезона. Для самок обнаружена слабая корреляция между изменением показателя Шеннона, рассчитанным на основе ISSR-маркеров и феноформ ($r = 0,5$), в то время как для самцов выявлена отрицательная корреляция ($r = -0,8$). Уровень разнообразия среди самок, оцененный двумя раз-

личными методами, постоянно превышает уровень разнообразия среди самцов.

Генетическая структура популяции в июне, июле и августе была оценена с помощью дендрограмм, построенных методом UPGMA на основе вычисленных по ISSR-характеристикам генетических дистанций между особями (рис. 4).

Июньская и августовская выборки жука характеризуются большим разнообразием по сравнению с июльской (среднее генетическое расстояние между особями 0,25; 0,24 и 0,21 соответственно). При этом генетические расстояния между большей частью августовской выборки (самка F189 и самцы M171–M176) не превышают 0,17, тогда как остальные самки вносят значительный вклад в увеличение общего уровня полиморфизма — кластеризация их с другими особями выборки происходит на уровне генетических расстояний 0,21–0,37.

Таблица 2
Динамика генетического разнообразия локальной популяции колорадского жука в течение летнего сезона согласно относительному показателю разнообразия Шеннона, вычисленному на основе феноформ и ISSR-маркеров

Пол	Июнь	Июль	Август
ISSR			
самки	0,84	0,75	0,88
самцы	0,73	0,73	0,80
суммарно	0,79	0,74	0,84
Феноформы			
самки	0,86	0,73	0,77
самцы	0,83	0,58	0,41
суммарно	0,85	0,66	0,59

Обсуждение полученных данных. Анализ разнообразия жуков в локальной популяции Киевской области был проведен двумя методами: молекулярно-генетическим с использованием ISSR-маркеров и фенетическим — по признакам рисунка на переднеспинке имаго. Для сравнения результатов, полученных различными методами и требующих различных подходов в статистической обработке, использован показатель относительного разнообразия Шеннона, позволяющий проводить сравнение в терминах информационной загруженности многокомпонентных систем независимо от природы анализируемых показателей.

Значения показателя Шеннона, полученные для популяции в целом по фенотипам и ISSR-маркерам, достоверно не различаются (70 и 79 % соответственно). В то же время динамика изменения показателя разнообразия, оцененная двумя методами в параллельных исследованиях, различна. Если оценка, сделанная на основе ISSR-маркеров, снижается в июле и затем снова возрастает в августе, то оценка, сделанная на основе анализа фенотипов, имеет тенденцию к снижению на протяжении всего лета. Динамика показателя разнообразия, оцененного по фенотипам, показывает, что признаки, связанные с характером рисунка, адаптивны и подвергаются действию отбора.

Природа использованных генетических маркеров различна. В то время как ISSR наиболее вероятно представляют собой некодирующие участки генома, которые, как правило, нейтральны [14], характер рисунка является результатом экспрессии многих генов, и некоторые из них могут подвергаться отбору. В частности, есть сведения о более высокой устойчивости жуков с 2, 3 и 6 типами рисунка переднеспинки к синтетическому пиретроидному инсектициду фастак [6]. По нашим данным, жуки с этими тремя вариантами рисунка переднеспинки преобладали в исследованной популяции (рис. 2 и 3), и их суммарное количество возрастало на протяжении лета.

Поскольку показано, что устойчивость к пиретроидным инсектицидам наследуется как рецессивный сцепленный с X-хромосомой признак [15], мы проанализировали также динамику изменения уровня полиморфизма с учетом пола жуков. Судя по синхронным изменениям показателя Шеннона при оценке двумя методами, уровень генетического разнообразия среди самок

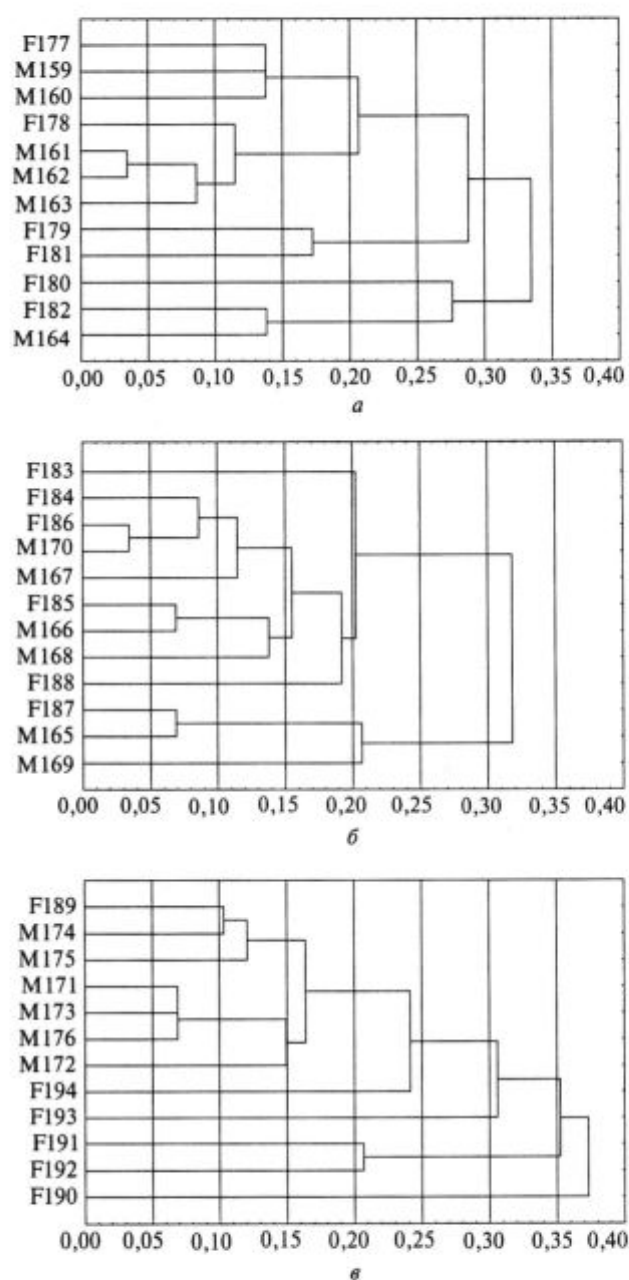


Рис. 4. Дендрограммы, построенные на основе анализа 29 ISSR-маркеров в популяции колорадского жука: а — июнь; б — июль; в — август. По горизонтали — генетические дистанции. М159-176 — самцы, F177-194 — самки

снижался в июле и затем снова возрастал к августу. У самцов динамика показателя, оцененного на основе ISSR-маркеров, была близка, тогда как при оценке по фенотипам этот показатель достоверно снижался в течение лета. Таким образом, основной вклад в расхождение между суммарными

показателями генетического разнообразия в популяции, определяемыми по фенотипам и ISSR-маркерам, вносят самцы.

Важно отметить также, что уровень разнообразия по выделенным девяти фенотипам был достоверно выше среди самок, чем среди самцов ($p < 0,1$ по критерию Стьюдента) на протяжении всех трех летних месяцев (рис. 3 и табл. 2). Сходные выводы о более высоком уровне генетического полиморфизма среди самок в этой популяции можно сделать из результатов анализа ISSR-маркеров (табл. 2). Более того, полученные в этой работе данные согласуются с результатами проведенного нами по RAPD-маркерам анализа генетического полиморфизма этой же локальной популяции колорадского жука в 1999 г. В этом случае уровень полиморфизма среди самок также постоянно превышал значения, полученные для самцов [11]. Остается пока не ясным, является ли это наблюдение особенностью лишь данной локальной популяции или справедливо повсеместно.

На формирование структуры локальных популяций оказывают влияние множество факторов, которые не всегда можно учесть и оценить в должной мере. Среди наиболее значительных — воздействие инсектицидами, миграционная активность, способность переносить неблагоприятные условия в состоянии диапаузы разной продолжительности. Использование ISSR-маркеров, обладающих высоким уровнем внутривидовой вариабельности и в то же время покрывающих почти весь геном, дает уникальную возможность анализа генетической структуры популяции. Поскольку особи, обладающие большей степенью родства, имеют и более сходные генотипы, характер кластеризации совокупности особей одной популяции на основе индивидуальных мультилокусных спектров должен визуализировать степень генетического родства между ними.

Полученные нами дендрограммы (рис. 4) показывают, что июльская выборка отличается от июньской меньшими генетическими расстояниями между особями по-видимому за счет того, что в этот период начинается выход взрослых особей новой генерации, имеющих сходные генотипы. Об этом, в частности, свидетельствует кластеризация большего количества особей июльской выборки по сравнению с июньской на уровне, не превышающем $GD = 0,10$ (8 и 3 соответственно). Однако наиболее значительное изменение гене-

тической структуры популяции, оцениваемое по имажинальной стадии, приходится на август. В этой выборке все самцы и одна самка группируются на относительно низком уровне генетических различий ($GD = 0,17$), тогда как генетические расстояния между ними и остальными самками, а также между разными особями у самок были значительно больше — от 0,21 до 0,38. Такая структура популяции может быть результатом повышенной миграционной активности самок в этот период. Вместе с тем наблюдаемая структура локальной популяции колорадского жука может формироваться в результате июньской обработки картофельных участков инсектицидами, большинство из которых относятся к пиретроидному ряду. На период конец июля — август приходится максимальный выход имаго новой генерации [1], и формирование отдельного кластера самцами возможно является потомством тех самок, которые резистентны к примененному инсектицидному препарату. По-видимому, не случайно то, что большая часть близкородственного кластера представлена самцами. Повышенная выживаемость самцов по сравнению с самками — ожидаемый результат при распространении в популяции сцепленного с X-хромосомой полурецессивного аллеля, каким является признак устойчивости к пиретроидам [15].

Интересно, что кластерный анализ, который сделан на основе RAPD-характеристик жуков, вышедших после зимовки весной предыдущего года на этом же участке, показал сходное распределение жуков по генетическим дистанциям: самцы и часть самок формировали отдельный кластер, тогда как остальные самки имели меньшее генетическое родство как с этими особями, так и между собой [16]. Эти данные не исключают также возможность, что оба фактора (миграции и отбор на устойчивость к инсектицидам) могут вносить вклад в формирование структуры данной популяции.

Таким образом, проведенный нами анализ показал, что оценки полиморфизма локальной природной популяции колорадского жука по ISSR-маркерам и по фенотипам в течение летнего периода различны. В отличие от ISSR-маркеров, по которым уровень разнообразия остается примерно на одном уровне в течение летнего сезона, полиморфизм исследованной популяции колорадского жука по фенотипам в этот же период

значительно снижается, свидетельствуя об адаптивности фенотипов. Использование ISSR-маркеров и фенотипов в комплексе позволяет получить комплементарные взаимодополняющие сведения о состоянии популяции. Полученные данные выявляют также различия в уровне генетического разнообразия среди самок и самцов. Причины более высокого уровня полиморфизма у самок по сравнению с самцами, на наш взгляд, заслуживают дальнейшего изучения.

SUMMARY. The level of genetic diversity was estimated in a local population of Colorado potato beetle using ISSR-markers and specific pronotum patterns. In contrast to the unchanged level of diversity in ISSR, Shannon's diversity index calculated on the base of pronotum pattern variants was decreasing during summer testifying adaptivity of that sign. The results also show the difference in the level of genetic diversity of females comparing to males.

РЕЗЮМЕ. Проведено порівняльну оцінку рівня генетичного поліморфізму в локальній популяції колорадського жука по ISSR-маркерах і специфічних формах малюнка передньоспинки імаго. На відміну від ISSR-маркерів, рівень різноманітності яких залишається приблизно на одному рівні на протязі літнього сезону, поліморфізм популяції за фенотипами в цей період значно знижується, що свідчить про адаптивність фенотипів. Отримані дані виявляють також розбіжності в рівні генетичної різноманітності серед самок і самців.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ушатинская Р.С. Колорадский картофельный жук, *Leptinotarsa decemlineata* Say. — М.: Наука, 1981. — 377 с.
2. Tower L.W. An investigation on evolution in Chrysomelid beetles of the genus *Leptinotarsa*. — Publ.Carnegie Inst., Washington, 1906. — 158 p.
3. Соколов А.М. Изменчивость морфологических признаков колорадского жука // Вопросы экологии и охраны животного мира Нечерноземной зоны РСФСР. — Иваново, 1978. — С. 18–23.
4. Кохманюк Ф.С. Изменчивость фенетической структуры популяций колорадского жука в пределах ареала // Фенетика популяций. — М.: Наука, 1982. — С. 233–243.

5. Фасулати С.Р. Полиморфизм и популяционная структура колорадского жука *Leptinotarsa decemlineata* Say в Европейской части СССР // Экология. — 1985. — № 6. — С. 50–56.
6. Новосельська Т.Г., Король Т.С. Колорадський жук. Чутливість популяції імаго до хімічного інсектициду фастак, 10 % к.е. // Захист рослин. — 2001. — № 1. — С. 14–15.
7. Zietkiewicz E., Rafalski A., Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeats (SSR)-anchored PCR amplification // Genomics. — 1994. — 20. — P. 176–183.
8. Reddy K.D., Nagaraju J., Abraham E.G. Genetic characterization of the silkworm *Bombyx mori* by simple sequence repeat (SSR)-anchored PCR // Heredity. — 1999. — 83. — P. 681–687.
9. Abbot P., Withgot J.H., Moran N.A. Genetic conflict and conditional altruism in social aphid colonies // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. — 2001. — 98. — P. 12068–12071.
10. Сидоренко А.П., Березовская О.П., Созинов А.А. Оценка генетического полиморфизма в популяциях колорадского жука *Leptinotarsa decemlineata* (Say) по RAPD-маркерам // Генетика. — 2000. — 36, № 5. — С. 651–656.
11. Сидоренко А.П., Березовская О.П. Индивидуальный полиморфизм по RAPD маркерам в весенней генерации колорадского жука *Leptinotarsa decemlineata* (Say) // Генетика. — 2001. — 37, № 10. — С. 1348–1352.
12. Pelletier Y. A method for sex determination of the Colorado potato beetle pupa, *Leptinotarsa decemlineata* (Coleoptera: Chrysomelidae) // Entomol. News. — 1993. — 104. — P. 140–142.
13. Артюкова Е.В., Козыренко М.М., Илюшко М.В., Журавлев Ю.Н., Реунова Г.Д. Исследование генетической изменчивости *Iris setosa* // Молекуляр. биология. — 2001. — 35, № 1. — С. 152–156.
14. Gupta M., Chyi Y.-S., Romero-Severson J., Owen J.L. Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using single primers of simple-sequence repeats // Theor. Appl. Genet. — 1994. — 89. — P. 998–1006.
15. Hawthorne D.J. AFLP-based genetic linkage map of Colorado potato beetle *Leptinotarsa decemlineata*: sex chromosomes and a pyrethroid-resistance candidate gene // Genetics. — 2001. — 158. — P. 695–700.
16. Сидоренко А.П., Березовская О.П. Генетическая структура популяций колорадского жука *Leptinotarsa decemlineata* (Coleoptera: Chrysomelidae) // Генетика. — 2002. — 38, № 11. — С. 1256–1261.

Поступила 25.10.02