

УДК 632.78:577.21

**ИЗМЕНЧИВОСТЬ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЙ СТРУКТУРЫ
ПОПУЛЯЦИЙ У ЯБЛОННОЙ ПЛОДОЖОРКИ *Cydia pomonella* (L.)
ПОД ВЛИЯНИЕМ ИНСЕКТИЦИДОВ И ДРУГИХ СТРЕССОВЫХ
ФАКТОРОВ ВНЕШНЕЙ СРЕДЫ***

В.И. КИЛЬ, Е.Н. БЕСЕДИНА

С использованием PCR-анализа оценили состав двух географических популяций яблонной плодовой жоржки по ДНК-маркерам. Описана молекулярно-генетическая структура исследуемых популяций вредителя и изучена ее изменчивость под влиянием инсектицидов, условий года и географического положения. По двум микросателлитным локусам исследовано внутривидовое генетическое разнообразие вредителя в садах с разной интенсивностью инсектицидных обработок. Показано, что генетическое разнообразие популяций у яблонной плодовой жоржки определяется главным образом ее генетическими особенностями, а не инсектицидным фактором или погодными условиями.

Ключевые слова: полиморфизм, генетическое разнообразие, микросателлитные локусы, популяция, яблонная плодовая жоржка, ДНК, RAPD-PCR, SSR-PCR.

Keywords: polymorphism, genetic diversity, microsatellite loci, population, codling moth, DNA, RAPD-PCR, SSR-PCR.

Изучение генетики популяций насекомых-вредителей имеет большое значение для мониторинга процессов их миграции и потока генов (1, 2). Кроме того, анализ изменчивости молекулярно-генетической структуры популяций способствует более глубокому пониманию механизмов развития резистентности насекомых к инсектицидам (3).

Яблонная плодовая жоржка *Cydia pomonella* (L.) (*Lepidoptera: Tortricidae*) — основной вредитель фруктового сада во всем мире. Свыше 70 % обработок плодовых культур инсектицидами связаны с контролем ее численности (4). Несмотря на значительный экономический ущерб, причиняемый яблонной плодовой жоржкой, об изменчивости генетической структуры и генетического разнообразия популяций *C. pomonella* под влиянием инсектицидов известно очень мало. В то же время подобные сведения важны при разработке стратегии защитных мероприятий (5).

Ранее мы исследовали молекулярно-генетическую структуру различных географических популяций яблонной плодовой жоржки по RAPD (randomly amplified DNA polymerase chain reaction), ISSR (inter simple sequence repeats) и SSR (simple sequence repeats) маркерам (6-9).

Цель настоящей работы заключалась в изучении влияния инсектицидов, географического положения и условий года на молекулярно-генетическую структуру и генетическое разнообразие популяций *Cydia pomonella*.

Методика. Объектом наблюдений (2008-2010 годы, Краснодарский край) были выборки из двух популяций яблонной плодовой жоржки. Насекомых отлавливали с помощью феромонных ловушек в садах с неодинаковой интенсивностью инсектицидных обработок: особой краснодарской популяции — в саду Всероссийского НИИ биологической защиты растений (ВНИИЗБР, до 12 обработок ежегодно), учхозе «Экологический сад» (4-5 обработок экологически малоопасными инсектицидами), учхозе «Органический сад» (без обработок), особой ейской — в садах «Колледж Ейский» (до 12 обработок ежегодно) и «Малюс» (без обработок). Объем каждой выборки составлял 20-60 насекомых.

Выделение ДНК, RAPD- и SSR-PCR проводили по протоколам,

* Работа выполнена при поддержке РФФИ и администрации Краснодарского края (грант № 09-04-96514).

описанным нами ранее (10, 11). Во избежание ошибки опыта в RAPD-PCR все исследуемые образцы ДНК анализировали одновременно в одной реакции (по каждому праймеру отдельно), на одном приборе, с использованием стандартного набора реактивов. Как мы уже отмечали, соблюдение таких условий достаточно для адекватной оценки результатов RAPD-PCR, в том числе при анализе ДНК насекомых из разных таксонов (12). В SSR-PCR использовали две пары праймеров (13), фланкирующих микросателлитные локусы: Cp1.63 — мотив повтора (GA)₁₉, Cp2.39 — мотив повтора (TC)₄AC(TC)₁₁. Продукты SSR-PCR разделяли в 8 % полиакриламидном геле длиной 20 см и толщиной 1 мм при напряжении 200-300 В в течение 5-6 ч. Визуализацию ампликонов после предварительного окрашивания бромистым этидием проводили в ультрафиолетовом свете, используя трансиллюминатор ЕСХ-20.М («Vilber Lourmat», Франция).

Степень ДНК-полиморфизма определяли как отношение числа полиморфных ДНК-фрагментов к общему числу ДНК-маркеров. Молекулярно-генетическую структуру описывали по частоте встречаемости ДНК-фрагментов и проводили сравнительную оценку изменчивости по критерию χ^2 . Сравнение средних значений по выборке выполняли по *t*-критерию Стьюдента с использованием программы Microsoft Excel. Оценка генетического разнообразия популяций, генетического сходства и кластерный анализ данных осуществляли по М. Nei и С. Shennon методом UPGMA (невзвешенный парно-групповой метод с арифметическим усреднением) в программе POPGENE v. 1.31.

Результаты. Влияние инсектицидов на внутрипопуляционное генетическое разнообразие. Результаты SSR-PCR анализа показали, что между насекомыми из краснодарской популяции *C. pomonella* видимые различия в ДНК-спектрах в целом отсутствовали (рис. 1). Это же наглядно демонстрировали данные статистической обработки (табл. 1).

1. ДНК-полиморфизм по SSR-маркерам и генетическое разнообразие популяций *Cydia pomonella* (L.) в садах с разной интенсивностью инсектицидных обработок (Краснодарский край, 2010 год)

Показатель	Краснодарская популяция			Ейская популяция	
	учхоз «Органический сад» (без обработок)	учхоз «Экологический сад»	ВНИИБЗР	сад «Малюс» (без обработок)	сад «Колледж Ейский»
Л о к у с Cp.1.63					
h	0,14±0,17	0,14±0,16	0,17±0,14*	0,08±0,09	0,08±0,06
I	0,23±0,23	0,22±0,23	0,29±0,18*	0,15±0,17	0,15±0,11
Л о к у с Cp.2.39					
h	0,22±0,15*	0,25±0,14*	0,22±0,17*	0,17±0,11	0,12±0,10
I	0,35±0,19*	0,40±0,19*	0,35±0,24*	0,30±0,16	0,22±0,15

Примечание. ВНИИБЗР — сад Всероссийского НИИ биологической защиты растений, до 12 обработок по насекомым ежегодно; учхоз «Экологический сад» и сад «Колледж Ейский» — соответственно 4-5 и до 12 обработок по насекомым ежегодно; h — генетическое разнообразие по М. Nei (среднее±стандартное отклонение), I — индекс Шеннона (среднее±стандартное отклонение).

* Достоверно отличаются от выборки из сада «Колледж Ейский» ($t_{\text{факт.}} \geq t_{05}$).

Оценка влияния инсектицидной нагрузки на внутрипопуляционный генетический полиморфизм у яблонной плодовой гусеницы показала, что как в краснодарской, так и в ейской популяции значения индексов генетического разнообразия в вариантах без обработок практически не отличались от таковых при инсектицидных обработках (различия были статистически не достоверны). При этом важно отметить, что даже значительное число инсектицидных обработок (в садах ВНИИБЗР и «Колледж Ейский» — до 12 ежегодно) не вызывало снижения внутрипопуляционного генетического раз-

нообразия у насекомых (см. табл. 1).

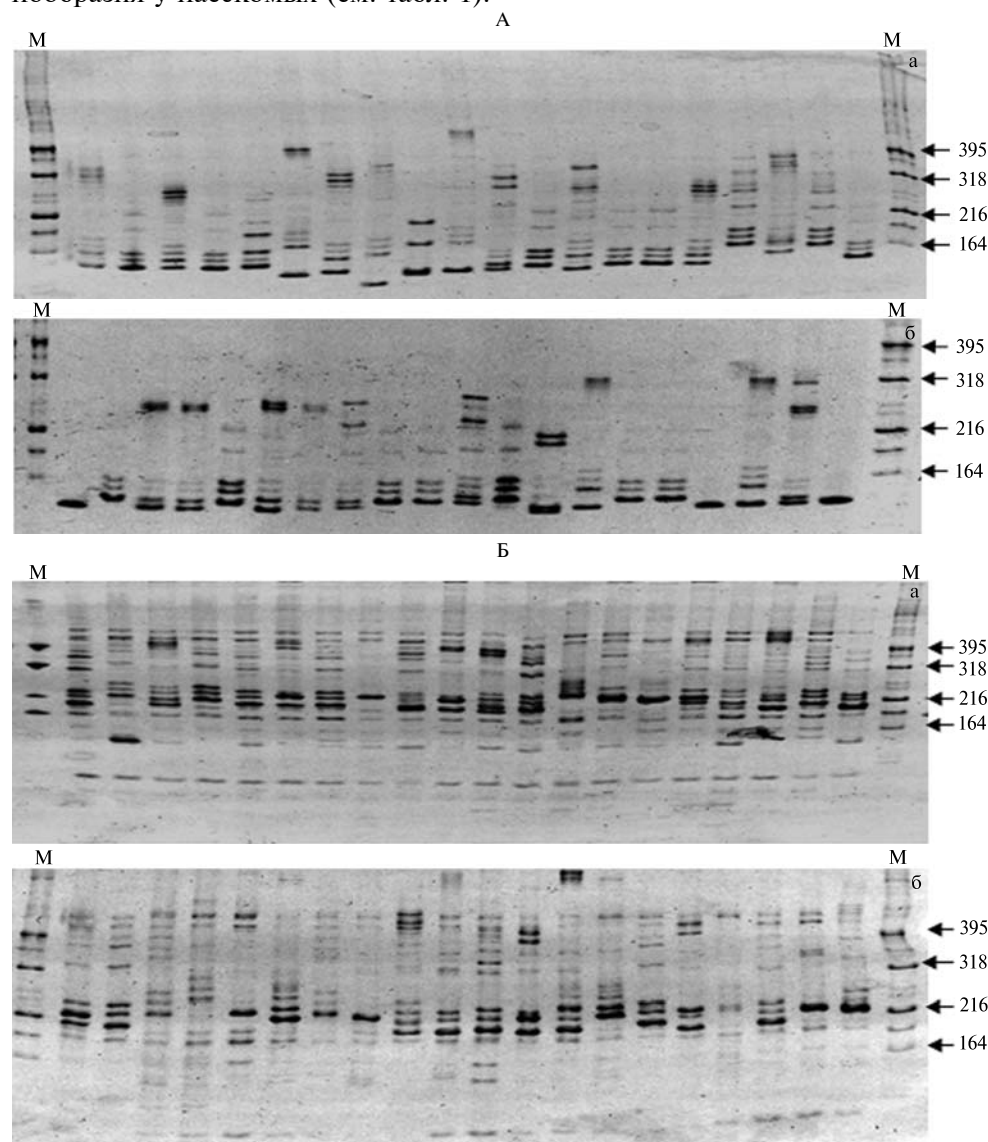


Рис. 1. Индивидуальные электрофореграммы ампликонов (SSR-PCR) по микросателлитным локусам Sr1.63 (А) и Sr2.39 (Б) у насекомых из краснодарской популяции *Cydia pomonella* (L.), собранных в садах с интенсивными инсектицидными обработками (а — Всероссийский НИИ биологической защиты растений, до 12 обработок по насекомым ежегодно) и без обработок (б — учхоз «Органический сад»): М — маркеры молекулярных масс, п.н. (8 % полиакриламидный гель) (Краснодарский край, 2010 год).

В то же время при сравнении двух исследуемых географических популяций яблонной плодовой гнили имелись достоверные различия, особенно четко выявляемые по локусу Sr2.39 (см. табл. 1). Так, генетическое разнообразие в краснодарской популяции *C. pomonella* было в 1,5-2,0 раза выше, чем в ейской (в целом по всем выборкам $t_{\text{факт.}} = 3,69 \geq t_{05}$). Это указывало на тот факт, что внутрипопуляционное генетическое разнообразие главным образом обусловлено географическим положением популяции (ее биологическими и генотипическими особенностями, определяемыми в том числе потоком генов), тогда как инсектицидные обработки не приводят к снижению генетического разнообразия в популяциях (ранее мы, наоборот, предполагали, что такое снижение возможно) (8, 9).

Подобное заключение подтверждалось оценкой генетического сходства исследуемых выборок. Наиболее близкими в генетическом отношении оказались ейские выборки из садов «Колледж Ейский» и «Малюс» (генетическая идентичность i по М. Nei равнялась 1,00), что свидетельствовало об их принадлежности к одной популяции. По аналогии выборки из краснодарской популяции были генетически близки ($i = 0,94-0,96$) и отличались от выборок из ейской популяции. Это наглядно демонстрировали и данные кластерного анализа (рис. 2), согласно которому исследуемые выборки входили в два кластера, соответствующие их географическому положению.

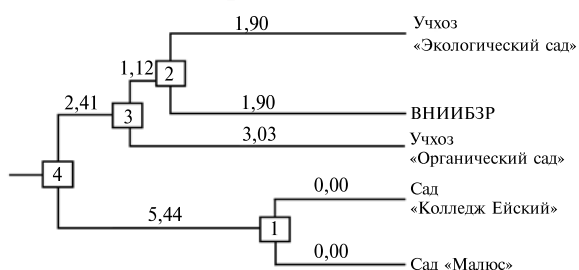


Рис. 2. Дендрограмма, отражающая генетические расстояния между ейской (1) и краснодарской (2 и 3) популяциями *Cudia pomonella* (L.) из садов с разной интенсивностью инсектицидных обработок (4) (см. раздел «Методика»). Дендрограмма построена методом UPGMA (невзвешенный парно-групповой метод с арифметическим усреднением) по М. Nei (Краснодарский край, 2010 год).

Таким образом, у яблонной плодовой жоржки внутрипопуляционное генетическое разнообразие не обусловлено числом инсектицидных обработок в садах. При этом очевидно, что инсектициды могут влиять не только на численность популяции насекомых в целом, но и на ее молекулярно-генетическую структуру, то есть частоту встречаемости отдельных генетических элементов. Однако подобный эффект не приводил к изменению внутрипопуляционно-

го генетического разнообразия, а различия по этому показателю определялись исключительно географическим положением популяций (их генетическими особенностями и условиями размножения).

Сделанные нами выводы согласуются с данными немецких ученых (14), изучавших устойчивость яблонной плодовой жоржки к бакуловирусу CpGV. Они выяснили, что даже при высоких показателях резистентности популяция вредителя оставалась генетически неоднородной и в ней присутствовали чувствительные к вирусному препарату насекомые. Следовательно, генетическое разнообразие у чувствительных и резистентных популяций может не различаться из-за гетерогенности последних.

Влияние условий года на молекулярно-генетическую структуру и генетическое разнообразие популяций. Для анализа изменчивости молекулярно-генетической структуры популяции яблонной плодовой жоржки в зависимости от условий окружающей среды были отобраны выборки насекомых из одного сада (ВНИИБЗР) в разные периоды исследований (2008 и 2010 годы). Инсектицидная нагрузка при этом не изменялась, однако погодные условия 2010 года характеризовались экстремально высокими температурами в летние месяцы (свыше 40 °С) и практически полным отсутствием осадков.

Результаты PCR-анализа краснодарской популяции *C. pomonella* по RAPD-маркерам выявили отсутствие сколько-нибудь видимых различий в ДНК-спектрах между двумя исследуемыми выборками (2008 и 2010 годов). В то же время в ряде случаев (по отдельным праймерам) в выборках насекомых отмечали неодинаковую частоту некоторых ДНК-маркеров. Кроме того, наблюдалось некоторое снижение числа ДНК-фрагментов на особь в 2008 году по сравнению с аналогичным показателем в 2010 году (табл. 2). Это, по-видимому, объясняется частичной деградацией водных растворов ДНК, хранившихся в течение 2 лет (с 2008 года) при -20 °С.

Однако в целом молекулярно-генетическая структура оставалась неизменной, статистически значимых отличий в ДНК-спектрах мы не обнаружили ($\chi^2_{\text{факт.}} \leq \chi^2_{05}$).

2. ДНК-полиморфизм по RAPD-маркерам в краснодарской популяции *Cydia pomonella* (L.) на фоне интенсивных инсектицидных обработок в разные годы исследований (Краснодарский край, сад Всероссийского НИИ биологической защиты растений)

RAPD-праймер	Степень ДНК-полиморфизма, %		Число детектируемых ДНК-фрагментов		Среднее число ДНК-фрагментов на особь		χ^2
	2008	2010	2008	2010	2008	2010	
ОРА02	100	100	19	18	5,9	7,5	8,4
ОРА06	100	100	15	16	4,4	7,8	21,2
ОРА20	94,7	94,7	19	19	4,5	6,9	25,2
ОРВ01	100	100	17	16	4,9	5,2	17,2
ОРВ08	94,1	94,1	12	17	4,3	5,3	12,8
ОРД06	100	100	11	15	4,0	5,9	18,2
ОРЕ07	100	94,1	17	17	5,3	7,4	22,5

Примечание. Число ежегодных обработок инсектицидами — до 12; $\chi^2_{\text{факт.}} \leq \chi^2_{05}$ (различия не достоверны).

Для того чтобы проверить предположение о частичной деградации ДНК, мы провели RAPD-анализ ейской популяции насекомых по двум праймерам — ОРА06 и ОРА20, сравнив препараты ДНК, которые находились при -20°C в течение 2 лет, со свежевыделенными (2011 год) из биоматериала той же выборки 2008 года (насекомых хранили в чашках Петри при $+4^\circ\text{C}$). В варианте, когда в PCR использовали ДНК после хранения при -20°C , по RAPD-праймеру ОРА06 имелись ампликоны, которые были выражены очень слабо или совсем отсутствовали, а по RAPD-праймеру ОРА20 насчитывалось достоверно меньше ДНК-фрагментов, чем при анализе свежевыделенной ДНК (в среднем на особь соответственно $8,7 \pm 0,92$ против $14,2 \pm 0,78$, $t_{\text{факт.}} = 4,59 \geq t_{05}$).

3. ДНК-полиморфизм по SSR-маркерам и генетическое разнообразие популяций *Cydia pomonella* (L.) на фоне интенсивных инсектицидных обработок в разные годы исследований (Краснодарский край)

Показатель	Ейская популяция (сад «Колледж Ейский»)		Краснодарская популяция (сад ВНИИБЗР)	
	2008	2010	2008	2010
	Л о к у с С р.1.63			
<i>n</i>	20	20	35	60
<i>A</i>	12	12	25	25
<i>Ag</i>	1,8	2,6	3,5	4,3
<i>h</i>	$0,14 \pm 0,09$	$0,19 \pm 0,14$	$0,14 \pm 0,13$	$0,15 \pm 0,15$
<i>I</i>	$0,26 \pm 0,14$	$0,31 \pm 0,20$	$0,24 \pm 0,19$	$0,26 \pm 0,19$
χ^2	13,3		23,0	
	Л о к у с С р.2.39			
<i>n</i>	20	20	26	60
<i>A</i>	27	27	32	32
<i>Ag</i>	5,1	5,9	8,5	11,3
<i>h</i>	$0,18 \pm 0,13$	$0,19 \pm 0,13$	$0,19 \pm 0,16$	$0,26 \pm 0,14^*$
<i>I</i>	$0,31 \pm 0,18$	$0,32 \pm 0,18$	$0,31 \pm 0,21$	$0,41 \pm 0,18^*$
χ^2	23,3		58,8*	

Примечание. ВНИИБЗР — Всероссийский НИИ биологической защиты растений; *n* — объем выборки, *A* — число аллелей, *Ag* — обогатенность аллелями (allelic richness), или средняя частота аллелей на одну особь, *h* — генетическое разнообразие по M. Nei (среднее \pm стандартное отклонение), *I* — индекс Шеннона (среднее \pm стандартное отклонение).

* Различия достоверны ($t_{\text{факт.}} \geq t_{05}$; $\chi^2_{\text{факт.}} \geq \chi^2_{05}$).

Выявленный факт свидетельствовал, что зафиксированные нами изменения в молекулярно-генетической структуре популяций были, скорее всего, вызваны не изменениями условий внешней среды, а деградацией водных растворов ДНК при хранении.

В отличие от RAPD-маркеров, микросателлитные SSR-маркеры об-

ладают большей воспроизводимостью ввиду более высокой температуры отжига в полимеразной цепной реакции и большей специфичностью связывания праймеров с ДНК-матрицей. Поэтому несомненный интерес представляло изучение изменчивости молекулярно-генетической структуры у исследуемых популяций насекомых по микросателлитным локусам под влиянием условий года. Результаты SSR-PCR анализа показали, что электрофоретические спектры ампликонов, полученные с использованием ДНК насекомых, собранных в 2010 году, характеризовались большим числом фрагментов по сравнению с таковыми в 2008 году (табл. 3). В краснодарской популяции *C. pomonella* такое изменение в молекулярно-генетической структуре и генетическом разнообразии (по локусу Sp.2.39) было к тому же статистически значимым ($t_{\text{факт.}} \geq t_{05}$; $\chi^2_{\text{факт.}} \geq \chi^2_{05}$). Кроме того, при анализе ДНК яблонной плодовой гнили в образцах 2008 года наблюдали некоторое уменьшение среднего числа ДНК-фрагментов на особь и снижение внутривидового генетического разнообразия по сравнению с аналогичными показателями в образцах 2010 года.

Таким образом, как и при анализе популяций *C. pomonella* по RAPD-маркерам, с SSR-маркерами, несмотря на более высокую специфичность связывания, также выявлялось общее снижение числа ДНК-маркеров в PCR-спектрах образцов ДНК, выделенных в 2008 году. По нашим данным, это объяснялось частичной деградацией водных растворов ДНК (образцы 2008 года), хранившихся в течение 2 лет при $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, а не изменениями в молекулярно-генетической структуре и генетическом разнообразии популяций яблонной плодовой гнили. Следовательно, как жаркое и сухое лето 2010 года, так и инсектициды не оказали деструктивного влияния на внутривидовое генетическое разнообразие.

Итак, в популяциях яблонной плодовой гнили *Cydia pomonella* (L.) влияние инсектицидов и условий года не приводит к снижению генетического разнообразия, а различия по этому показателю, наблюдаемые между популяциями, определяются в первую очередь их географическим положением (генетическими особенностями). Очевидно, что стрессовые факторы внешней среды, будь то инсектициды или экстремальные погодные условия, могут сказаться на численности или молекулярно-генетической структуре популяции *C. pomonella*, то есть на частоте некоторых генотипов. Однако, как свидетельствуют наши эксперименты, это не всегда означает, что одновременно снижается внутривидовое генетическое разнообразие особей. Выполняя сравнительный PCR-анализ с различными выборками насекомых, необходимо также учитывать тот факт, что при хранении возможна частичная деградация водных препаратов выделенной тотальной ДНК (например, из-за размораживания при аварийном отключении электроэнергии). Подобные изменения неизбежно приводят к снижению числа ДНК-фрагментов в анализируемых PCR-спектрах (RAPD- и SSR-PCR). В этой связи мы рекомендуем сохранять биоматериал (насекомых) в чашках Петри при $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$, а водные препараты ДНК лиофилизировать или пересаживать этанолом и хранить в морозильной камере (при $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$).

Авторы выражают искреннюю благодарность О.Д. Ниязову и Е.С. Сугоняеву за предоставленный биоматериал.

ЛИТЕРАТУРА

1. Scott L.J., Lawrence N., Lange C.L. et al. Population dynamics and gene flow of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) on cotton and grain crops in the Murrumbidgee Valley, Australia. J. Econ. Entomol., 2006, 99: 155-163.

2. Endersby N.M., Hoffmann A.A., McKeechie S.W., Weeks A.R. Is there genetic structure in populations of *Helicoverpa armigera* from Australia? *Entomol. Exp. Appl.*, 2007, 122: 253-263.
3. Timm A.E., Geertsema H., Warnich L. Gene flow among *Cydia pomonella* (L.) (*Lepidoptera: Tortricidae*) geographic and host populations in South Africa. *J. Econ. Entomol.*, 2006, 99: 341-348.
4. Franck P., Reyes M., Olivares J., Sauphanor B. Genetic architecture in codling moth populations: comparison between microsatellite and insecticide resistance markers. *Mol. Ecol.*, 2007, 16: 3554-3564.
5. Calkins C.O., Faust R.J. Overview of areawide programs and the program for suppression of codling moth in the western USA directed by the United States Department of Agriculture — Agricultural Research Service. *Pest. Manag. Sci.*, 2003, 59: 601-604.
6. Киль В.И., Беседина Е.Н., Федичева О.О. ДНК полиморфизм различных популяций яблонной плодовой гнили *Cydia pomonella* (L.) (*Lepidoptera: Tortricidae*). Тр. Ставропольского отделения Русского энтомологического общества (мат. II Межд. науч.-практ. интернет-конф. «Актуальные вопросы энтомологии»), 2009, 5: 154-157.
7. Киль В.И., Беседина Е.Н., Федичева О.О. Молекулярно-генетический анализ популяций яблонной плодовой гнили *Cydia pomonella* L. по RAPD- и ISSR-маркерам. Инф. бюл. Восточно-Палеарктической региональной секции Международной организации по биологической борьбе с вредными животными и растениями (мат. докл. Межд. симп. «Защита растений — достижения и перспективы», г. Кишинев), 2009, 40: 92-94.
8. Киль В.И. Молекулярно-генетический анализ популяций яблонной плодовой гнили *Cydia pomonella* по микросателлитным локусам. Мат. Межд. науч.-практ. конф. «Биологическая защита растений — основа стабилизации агроэкосистем». Краснодар, 2010, вып. 6: 281-284.
9. Киль В.И. ДНК-полиморфизм и генетическое разнообразие популяций яблонной плодовой гнили и хлопковой совки по микросателлитным локусам. Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного университета, 2010, 62(08), октябрь (<http://ej.kubagro.ru/2010/08/pdf>).
10. Киль В.И. Методика оценки ДНК-полиморфизма популяций насекомых с помощью ПЦР (RAPD- и ISSR-PCR): метод. реком. Краснодар, 2009.
11. Киль В.И. ДНК-технология ПЦР-анализа популяций яблонной плодовой гнили по микросателлитным локусам. Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного университета, 2011, 68(04), апрель (<http://ej.kubag-ro.ru/2011/04/pdf>).
12. Киль В.И., Гронин В.В., Крутенко Д.В., Исмаилов В.Я. О полиморфизме RAPD-маркеров у различных таксонов полужесткокрылых (*Hemiptera*). *Сельскохозяйственная биология*, 2008, 1: 70-76.
13. Franck P., Guérin F., Loiseau A., Sauphanor B. Isolation and characterization of microsatellite loci in the codling moth *Cydia pomonella* L. (*Lepidoptera, Tortricidae*). *Molecular Biology Notes*, 2005, 5(1): 99-102.
14. Asser-Kaiser S., Fritsch E., Undorf-Spahn K., Kienzle J., Eberle K.E., Gund N.A., Reineke A., Zebitz C.P.W., Heckel D.G., Huber J., Jehle J.A. Rapid emergence of Baculovirus resistance in codling moth due to dominant sex linked inheritance. *Science*, 2007, 317: 1916-1918.

ГНУ Всероссийский НИИ биологической
защиты растений Россельхозакадемии,
350039 г. Краснодар-39, ВНИИБЗР,
e-mail: vlkil@inbox.ru

Поступила в редакцию
19 сентября 2011 года

VARIABILITY OF MOLECULAR GENETIC STRUCTURE IN CODLING MOTH *Cydia pomonella* (L.) POPULATIONS UNDER THE INFLUENCE OF INSECTICIDES AND ENVIRONMENTAL STRESSES

V.I. Kil', E.N. Besedina

S u m m a r y

The results of the PCR analysis of two codling moth populations using RAPD and SSR markers are presented. The molecular genetic structure of investigated pest populations is described and its variability under influence of insecticides, varying climatic conditions during 2008 to 2011 and geographic location is studied. The intra-population genetic diversity by two microsatellite loci was estimated in pests from the gardens with different insecticide press. Genetic diversity of codling moth populations was shown to depend mainly on genetic features of the populations, but not on the insecticide load or weather conditions.