



УДК 575.22; 502.4

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА ПОПУЛЯЦИЙ КЛОПА *EURYGASTER INTEGRICEPS* В УСЛОВИЯХ АГРОЦЕНОЗОВ ЮГА СРЕДНЕРУССКОЙ ВОЗВЫШЕННОСТИ¹

З.А. Снегин, К.Д. Курносова

Белгородский государственный национальный исследовательский университет, Россия, 308015, г. Белгород, ул. Победы, 85

E-mail: snegin@bsu.edu.ru

На основе фенетического подхода и анализа ДНК-маркеров (*ISSR*) проведено изучение генетической структуры популяций клопа вредной черепашки (*Eurygaster integriceps* Puton), обитающих в условиях агроценозов юга Среднерусской возвышенности. Определен уровень изменчивости и вычислена степень дифференциации популяций. Выдвигается предположение о форме естественного отбора в изучаемых группах.

Ключевые слова: *Eurygaster integriceps*, вредитель, популяции, генетическая структура, агроценозы.

Введение

Предлагаемая вашему вниманию работа посвящена изучению генетической изменчивости популяций клопа вредной черепашки (*Eurygaster integriceps* Puton), который является опасным вредителем растений семейства злаковых. Известно, что исследования в этом направлении тесно связаны с успешным осуществлением программы защиты сельскохозяйственных растений от вредных насекомых. В этой связи изучению генетической структуры данного вида посвящено ряд работ, проведенных, как на основе анализа фенотипической изменчивости [1, 2, 3], так и с использованием молекулярных маркеров [4, 5, 6, 7]. Цель настоящих исследований состояла в изучении особенностей фенотипов и генофондов популяций *E. integriceps* в различных агроценозах юга Среднерусской возвышенности.

Материал и методы

Исследования проводилась в пяти пунктах Белгородской области (табл. 1).

Таблица 1

Описание пунктов сбора *Eurygaster integriceps*

Пункт	Описание	Дата сбора
1. Прохоровка	Ячменное поле в окрестностях с. Прохоровка (Прохоровский район).	август 2011
2. Скородное	Пшеничное поле, находящееся между с. Скородным и с. Холдным (Губкинский район).	август 2011 г.
3. ЛГОК	Пшеничное поле вблизи отвалов Лебединского ГОК (Губкинский район).	июнь 2011 г.
4. Белгород	Овсяное поле в пределах городской черты г. Белгорода, район аэропорта.	август 2012 г.
5. Ракитное	Ячменное поле вблизи с. Ракитное (Ракитянский район).	август 2011г.

Видовую принадлежность собранных особей определяли по ключевым морфологическим признакам и строению половой системы [8].

Для фенетического анализа нами были использованы цветовые вариации кутикулы, а также степень выраженности рисунка щитка, переднеспинки и надкрылий. Всего проанализировано 346 особей, у которых выделено 10 фенотипов (рис. 1, таблица 2). В пределах первых семи фенотипов встречаются особи с различной степенью окраски кутикулы (темные, светлые и промежуточные формы) с элементами рисунка. Три оставшиеся формы (8, 9, 10) характеризуются однотонной окраской без рисунка. Стоит отметить, что выявленные цветовые варианты рассматриваются нами как проявление модификационной изменчивости.

¹ Работа выполнена при поддержке МО РФ, госзадание № 4.8480.2013.



Рис.1. Фенотипы *E. integriceps* (описание приводится в таблице 2; светлыми линиями выделены некоторые элементы рисунка)

Таблица 2

Описание фенотипов *E. integriceps*

Фенотип	Описание
1	Четко выраженный светлый рисунок, все элементы которого соединяются между собой.
2	Четко выраженный светлый рисунок, все элементы которого явно разделены между собой.
3	Четко выражена верхняя часть рисунка, нижние парные пятна размыты.
4	Неясно выражены нижнее одиночное пятно и парные верхние, остальные элементы рисунка отсутствуют.
5	Неясно выражены верхние элементы рисунка и нижнее непарное пятно, нижних парных пятен нет.
6	Неясно выражены верхние элементы рисунка, слабо заметны нижние парные пятна, нижнее непарное пятно выражено четко.
7	Окраска кутикулы темная, очень контрастно выделяются верхние парные пятна и нижнее непарное пятно.
8	Черная окраска кутикулы с коричневато-кирпичными нечетко выраженными пятнами.
9	Черная окраска кутикулы, без каких-либо светлых пятен.
10	Однотонная светло-коричневая окраска кутикулы без выраженных пятен.

Генетический анализ проводился с использованием метода полимеразной цепной реакции – метод *ISSR (Inter simple sequence repeats)* [9]. ДНК выделяли из фрагментов брюшка насекомого с лизирующим буфером, содержащим протеиназу К. Амплификацию проводили в термоциклере MyCycler (Bio-Rad), используя праймер *SAS-1 (5'-GTGGTGGTGGTGGC-3')*.

Реакцию проводили в 25 мкл смеси, содержащей 20 нг геномной ДНК, ПЦР-буфер (67 mM трис-*HCl* (pH 8.8), 16 mM $(NH_4)_2SO_4$, 5 mM β -меркаптоэтанол, 7 mM ЭДТА, 3 mM *MgCl*), 0.25 mM *dNTP*, 0.5 мкМ праймера, 1 единица *Taq* ДНК полимеразы (ингибированной для горячего старта). Реакция проходила в следующих условиях: «горячий старт» – 2 мин/94 °С, 40 циклов (денатурация -30 с/94 °С, отжиг праймера – 30 с/55 °С, синтез – 2 мин/72°С), дополнительный синтез – 10 мин/72 °С, охлаждение до 4 °С. Продукты ПЦР разделяли с помощью электрофореза в 2 % агарозном геле с использованием ТАЕ буфера (охлажденного до +4 °С), 100 В – 45 мин. Блоки окрашивали бромистым этидием.

По картинам амплифицированных фрагментов, полученных в ходе электрофореза составляли бинарные матрицы, где присутствие полосы обозначалось как «1» (аллель *p*), отсутствие «0» (аллель *q*). У данного вида нами обнаружено 16 локусов.



Всего нами были проанализированы генотипы 121 особи. Обработка полученных данных проводилась с использованием программы GenAlEx [10].

Результаты исследований

Согласно данным, представленным в таблице 3, практически во всех изученных группах, за исключением четвертой («Белгород»), преобладают особи с фенотипом, который относится к типу 2. В четвертой же популяции наибольшую частоту имеет тип 6, для которого характерна слабая выраженность элементов рисунка переднеспинки и щитка. Так же, только в этой группе, встречается тип 10, который характеризуется светлой окраской кутикулы и отсутствием элементов рисунка. Такие отличительные особенности группы «Белгород», вероятно, вызваны обитанием на овсяном поле, которое является более осветленным биотопом по сравнению с пшеничными и ячменными агроценозами.

Таблица 3

Частоты фенотипы в изученных популяциях *E. integriceps*

Популяция	Тип 1	Тип 2	Тип 3	Тип 4	Тип 5	Тип 6	Тип 7	Тип 8	Тип 9	Тип 10
1. «Прохоровка»	0.042	0.396	0.063	0.125	0.083	0.208	0.021	0.021	0.042	0.000
2. «Скородное»	0.057	0.425	0.057	0.161	0.069	0.195	0.000	0.023	0.011	0.000
3. «ЛГОК»	0.041	0.378	0.027	0.189	0.041	0.284	0.041	0.000	0.000	0.000
4. «Белгород»	0.079	0.286	0.063	0.032	0.111	0.317	0.016	0.000	0.000	0.095
5. «Ракитное»	0.095	0.392	0.054	0.108	0.081	0.203	0.027	0.014	0.027	0.000

Для оценки степени фенотипического разнообразия популяций был вычислен индекс Шеннона (табл. 4), согласно которому наиболее разнообразными являются популяции «Белгород» (4) и «Ракитное» (5). Показатель μ (среднее число фенотипов), который показывает количество разных фенотипов выборке с учетом их частот, также наиболее высок именно в этих группах. Самой мономорфной оказалась популяция, обитавшая вблизи отвалов Лебединского ГОК (3). Доли редких фенотипов ($h\mu$) во всех изученных группах достоверно не отличаются.

Таблица 4

Значение показателей биологического разнообразия в изученных группах

Выборка	<i>N</i>	<i>m</i> (число фенотипов)	<i>I_{sh}</i> (индекс Шеннона)	μ (среднее число фенотипов)	$h\mu$ (доля редких морф)
1. «Прохоровка»	48	9	1.76	7.15±0.52	0.21±0.06
2. «Скородное»	87	8	1.63	6.23±0.36	0.22±0.04
3. «СГОК»	74	7	1.53	5.53±0.33	0.21±0.05
4. «Белгород»	63	8	1.74	6.64±0.38	0.17±0.05
5. «Ракитное»	74	9	1.77	7.16±0.42	0.20±0.05

Примечание: показатели μ и $h\mu$ оценены по Л.А. Животовскому [11].

Для получения представления о генетической структуре популяций изучаемого вида, как уже было сказано, нами был проведен межмикросателлитный анализ ДНК (метод *ISSR*). В таблице 5 приведены данные об уровне гетерозиготности исследованных локусов. Согласно полученным данным по изменчивости локусов популяции сильно отличаются друг от друга (табл. 5). Так, например, в первой группе наиболее изменчивыми оказались локусы 11 и 14, во второй группе – локусы 6 и 16, в третьей группе – локусы 6 и 10, в четвертой группе – локусы 10, 12 и 15, а в пятой группе – 11, 13, 15. При этом, если оценивать усредненные значения, вычисленные по всем популяциям, то наиболее изменчивыми оказались локусы 6 и 15, а самыми мономорфными были локусы с 1-го по 4-й.

Таблица 5

Уровень ожидаемой гетерозиготности (H_e) и процент полиморфных *ISSR*-локусов ДНК (P) в изучаемых популяциях *E. integriceps*

Локусы	Популяции				
	1 (<i>N</i> =25)	2 (<i>N</i> =23)	3 (<i>N</i> =25)	4 (<i>N</i> =25)	5 (<i>N</i> =23)
<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>
1	0.116	0.000	0.000	0.000	0.126
2	0.078	0.000	0.000	0.040	0.126
3	0.224	0.000	0.040	0.040	0.043
4	0.040	0.043	0.289	0.040	0.043



Окончание таблицы 5

1	2	3	4	5	6
5	0.289	0.166	0.289	0.289	0.126
6	0.320	0.484	0.447	0.377	0.241
7	0.224	0.126	0.289	0.116	0.166
8	0.257	0.166	0.224	0.224	0.204
9	0.224	0.085	0.116	0.257	0.204
10	0.349	0.043	0.498	0.491	0.241
11	0.465	0.000	0.189	0.224	0.401
12	0.320	0.000	0.426	0.498	0.311
13	0.153	0.373	0.402	0.153	0.401
14	0.426	0.241	0.189	0.289	0.204
15	0.320	0.373	0.320	0.498	0.401
16	0.116	0.495	0.377	0.078	0.000
He (сред)	0.245±0.031	0.162±0.045	0.256±0.040	0.226±0.043	0.202±0.032
P(%)	100	68.75	87.50	93.75	88.75

При этом стоит отметить, что данные, полученные по фенотипической изменчивости и по изменчивости ДНК-локусов в целом для популяций, отчасти не совпадают. Так, по ДНК-локусам самыми изменчивыми оказались группы 1 и 3, а по окрасочным признакам – 1 и 5. Самой мономорфной по локусам ДНК является группа «Скородное» (2), а по фенетическим показателям – группа «ЛГОК» (3). В этой связи хотелось бы подчеркнуть, что такое несоответствие, вероятно, обусловлено тем, что вариации окрасочных признаков у данного вида больше обеспечиваются модификационной изменчивостью генотипа, тогда как полиморфизм ДНК обусловлена различиями в последовательности нуклеотидов у разных особей.

В дальнейшем нами была оценена степень генетической близости между исследуемыми популяциями. С этой целью на основе данных о частотах *p* аллеля ДНК были построены полигоны Дебеца (рис. 2), а также проведен кластерный анализ с использованием значений генетических расстояний, рассчитанных по Неи [12] (рис. 3). Согласно построенным схемам наиболее генетически близкими являются группы «Проخورовка» (1) и «Ракитное» (5), а также «ЛГОК» (3) и «Белгород» (4). Наиболее мономорфная популяция из пункта «Скородное» (2) дистанцировалась от остальных групп.

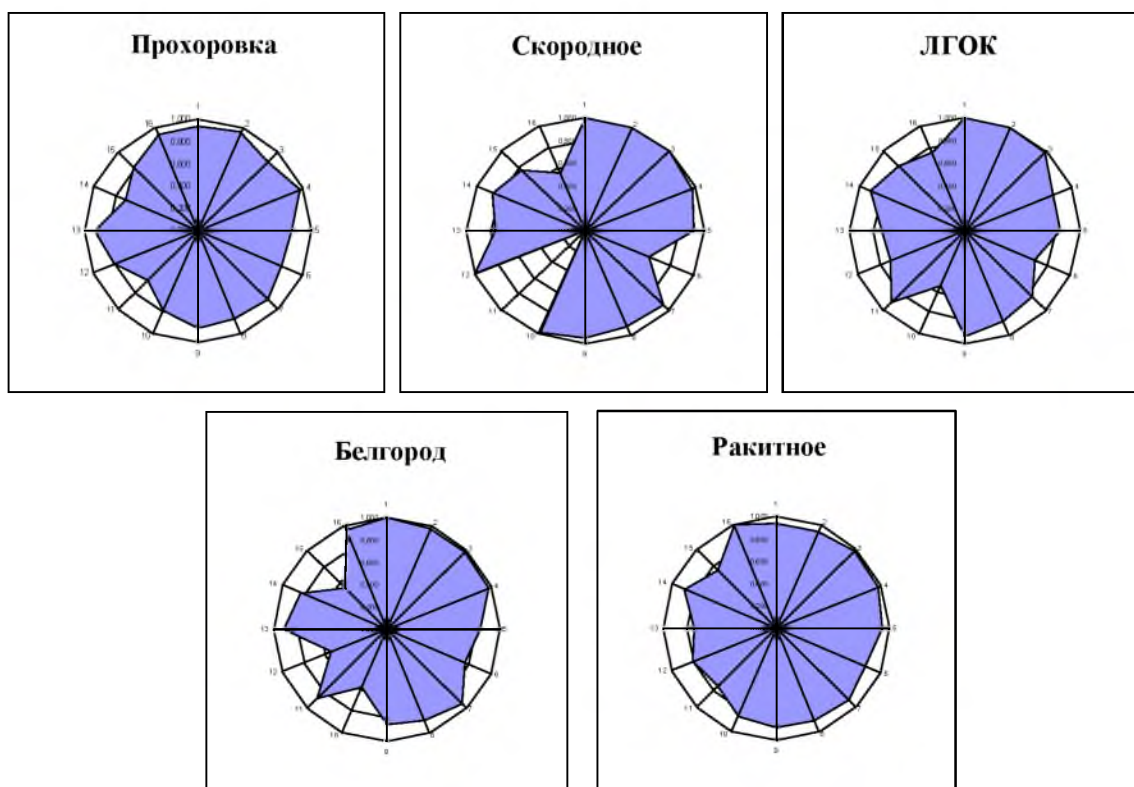


Рис. 2. Полигоны Дебеца, построенные по совокупности частот *p*-аллеля 16 локусов ДНК в популяциях *E. integriceps*

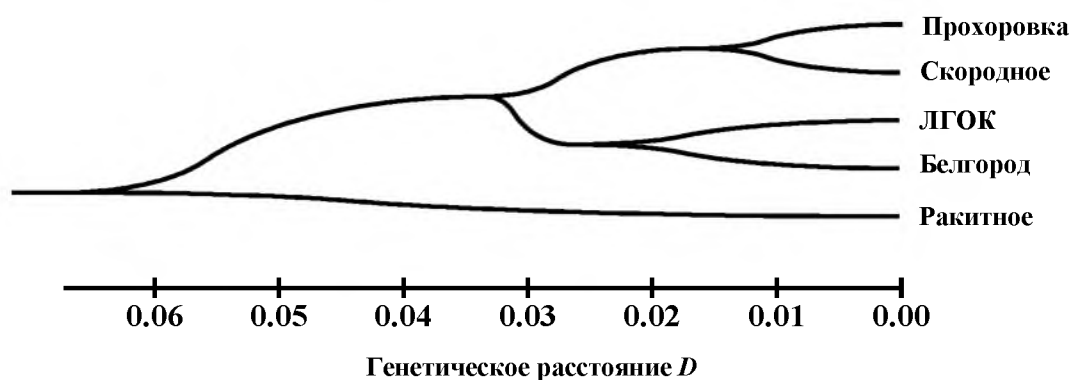


Рис. 3. Дендрограмма генетических расстояний по Неи (Nei, 1972) (UPGMA) между популяциями *E. integriceps*

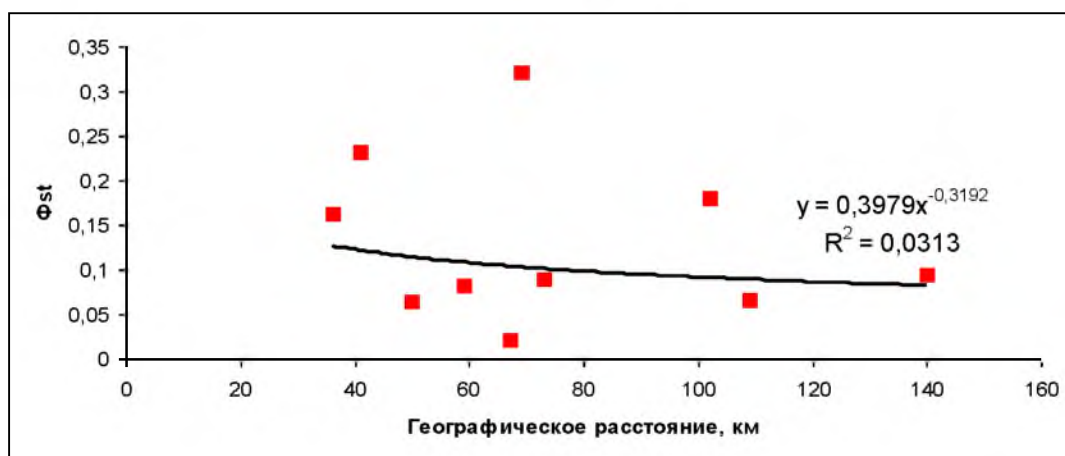


Рис. 4. Значение показателя дифференциации Φ_{st} между парами популяций *E. integriceps* в зависимости от географического расстояния между ними

Тем не менее, степень генетической дифференциации изученных популяций, оцененная с помощью анализа молекулярной дисперсии (AMOVA) [13], оказалась незначительной (табл. 6). Так, например, уровень внутрипопуляционной изменчивости в группах значительно превзошел межпопуляционную (87% против 13% соответственно). При этом, средний поток генов между популяциями (Nm) составил чуть больше трех особей за поколение, а индекс дифференциации $\Phi_{st} = 0.131$. Эти факты говорят с одной стороны о значительной миграционной активности изучаемых популяций, а с другой стороны свидетельствуют о сходных векторах естественного отбора, вызванных, вероятно, похожими условиями существования, которые сложились в монокультурных агроценозах.

Таблица 6

Значения молекулярной дисперсии (AMOVA) по ДНК-локусам в популяциях *E. integriceps*

Источник изменчивости	Число степеней свободы (df)	Сумма квадратов (SS)	Средний квадрат (MS)	Дисперсия (V)	%	Φ_{st}	P	Nm
Между популяциями	4	46.821	11.705	0.380	13	0.131	0.010	3.009
Внутри популяций	116	291.510	2.513	2.513	87			
Итого	120	338.331	14.218	2.893				

Кроме того, проведенный нами анализ регрессии между попарными оценками индекса Φ_{st} и значениями географических расстояний между популяциями не выявил корреляционной зависимости между этими двумя показателями (рис. 4; $R = -0,177$). Это говорит о преобладании в изученных группах стабилизирующей формы отбора, который нарушает эффект изоляции расстоянием.



В заключение стоит отметить, что данная работа является отправной точкой для изучения генетических процессов, происходящих в популяциях *E. integriceps* в районе исследования. В дальнейшем предполагается охватить большее количество популяций и задействовать несколько различных типов молекулярных маркеров, что позволит получить более достоверную картину состояния популяционных генофондов данного вида в условиях агроландшафтов юга Среднерусской возвышенности.

Список литературы

1. Фасулати С. Р. Внутривидовая изменчивость и роль антропогенных факторов микроэволюции у вредной черепашки // Материалы 2-го Всероссийского съезда по защите растений «Резистентность вредных организмов к пестицидам». – СПб.: ВИЗР, 2005. – С. 74–77.
2. Махоткин А. Г., Махоткина Л. Я. К вопросу о связи фенотипической изменчивости и резистентности вредной черепашки к инсектицидам // Материалы Международной научно-практической конференции «Биологическая защита растений – основа стабилизации агроэкосистем». – Краснодар, 2006. – Вып. 4. – С. 420–422.
3. Киль В. И. К вопросу о мониторинге резистентности популяций клопа вредная черепашка к инсектицидам по фенам рисунка и окраски имаго // Труды Ставропольского отделения Русского энтомологического общества: материалы II Международной научно-практической интернет-конференции «Актуальные вопросы энтомологии». – Ставрополь: АГРУС, 2009. – Вып.5. – С. 220–223.
4. Saeedi Z., Esmaili M., Abd-Mishani C. E. A. Detection of DNA polymorphisms between populations of *Eurygaster integriceps* Put. in Iran using *RAPD-PCR* // Iranian J. Agricult. – 1999. – Vol. 30(2). – P. 331–340.
5. 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. – С. 70–76.
6. Киль В. И. Полиморфизм ДНК популяции клопа вредная черепашка *Eurygaster integriceps* Put (Hemiptera: Scutelleridae) по *RAPD*- и *ISSR*-маркерам // Труды международной конференции «Информационные системы диагностики, мониторинга и прогноза важнейших сорных растений, вредителей и болезней сельскохозяйственных культур». – СПб.-Пушкин, 2008. – С. 45–46.
7. Киль В. И. ДНК технологии в защите сельскохозяйственных растений от вредных насекомых – Краснодар: ООО «Просвещение-Юг», 2009. – 160 с.
8. Определитель насекомых европейской части СССР/ под ред. Г.Я. Бей-Биенко. Т.1 – Л.: Наука, 1964. – 937 с.
9. Zietkiewicz E., Rafalski A., Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) – anchored polymerase chain reaction amplification // Genomics. – 1994. – Vol. 20, № 2. – P. 176–181.
10. Peakall R., Smouse P.E., GenAlEx V5: Genetic Analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. Australian National University. – Canberra, Australia, 2001. – <http://www.anu.edu.au/BoZo/GenAlEx/>.
11. Животовский Л. А. Популяционная биометрия – М.: Наука, 1991. – 271 с.
12. Nei M. Genetic distance between populations // The American Naturalist. – 1972. – Vol. 106, № 949. – P.283–292.
13. Excoffier L., Smouse P. E., Quattro J. M., Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data // Genetics. – 1992. – № 131. – P. 479–491.

GENETIC STRUCTURE OF THE BUG POPULATION (*EURYGASTER INTEGRICEPS*) IN THE AGRICULTURAL LANDS OF THE SOUTH MID-RUSSIAN UPLAND

E.A. Snegin, K.D. Kurnosova

Belgorod State National Research University, 85, Pobedy St., Belgorod, 308015, Russia

E-mail: snegin@bsu.edu.ru

On the basis of phenetic approach and analysis of DNA markers (ISSR) study of the genetic structure of populations of the bug (*Eurygaster integriceps* Puton), living in the conditions of agricultural lands in south Mid-Russian Upland, was conducted. The level of variability has been identified and the degree of differentiation of populations was calculated. The assumption about the form of natural selection in the groups studied has been put forward.

Key words: bug, pest, population, genetic structure, agricultural lands.