

УДК 575.595:577.633

UDC 575.595:577.633

**ДНК-ПОЛИМОРФИЗМ И ГЕНЕТИЧЕСКОЕ
РАЗНООБРАЗИЕ ПОПУЛЯЦИЙ ЯБЛОННОЙ
ПЛОДОЖОРКИ И ХЛОПКОВОЙ СОВКИ ПО
МИКРОСАТЕЛЛИТНЫМ ЛОКУСАМ**

**DNA POLYMORPHISM AND GENETIC
DIVERSITY OF CODLING MOTH AND
BOLLWORM POPULATIONS BY
MICROSATELLITE LOCI**

Киль Владимир Ильич

к.с.-х.н

*ВНИИ биологической защиты растений
Россельхозакадемии, Краснодар, Россия*

Kiel Vladimir Ilyich

Cand. Agr. Sci.

*All-Russian Research Institute of Biological Plant
Protection of RAAS, Krasnodar, Russia*

По двум микросателлитным локусам (HaSSR1, HaSSR3) проведен ПЦР анализ Краснодарской популяции хлопковой совки. Проведен также молекулярно-генетический анализ (SSR-PCR) различных географических популяций яблонной плодовой жорки по трем микросателлитным локусам *Cp1.63*; *Cp2.39* и *Cp2.157*. На основании частот встречаемости ДНК-маркеров описана молекулярно-генетическая структура и оценено генетическое разнообразие популяций вредителей

Using two microsatellite loci (HaSSR1, HaSSR3), the PCR analysis of the bollworm Krasnodar population was conducted. Molecular-genetic analysis (SSR-PCR) of different geographic codling moth populations by three microsatellite loci *Cp1.63*; *Cp2.39* and *Cp2.157* was conducted also. Based on the assessment of the frequencies of occurrence of DNA markers, the molecular-genetic structure was described and genetic diversity in the pest populations was estimated

Ключевые слова: ХЛОПКОВАЯ СОВКА, ЯБЛОННАЯ ПЛОДОЖОРКА, ПОЛИМОРФИЗМ, ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ, МИКРОСАТЕЛЛИТЫ, ПОПУЛЯЦИЯ, НАСЕКОМЫЕ, ДНК, ПЦР

Keywords: BOLLWORM, CODLING MOTH, POLYMORPHISM, GENETIC DIVERSITY, MICROSATELLITE LOCI, POPULATION, INSECTS, DNA, PCR

Изучение генетики популяций сельскохозяйственно-значимых вредных насекомых имеет большое значение в понимании миграционных процессов и потока генов при мониторинге вредителей [1,2]. Для успешного контроля численности таких вредителей сельскохозяйственных растений, как хлопковая совка *Helicoverpa armigera* Hbn. (Lepidoptera: Noctuidae) и яблонная плодовая жорка, *Cydia pomonella* (L.) (Lepidoptera: Tortricidae), необходимо всестороннее изучение изменчивости генетической структуры популяций этих видов насекомых, в том числе и на молекулярном уровне. Оценка изменчивости молекулярно-генетической структуры популяций насекомых будет способствовать также более полному пониманию микроэволюционных процессов, связанных с адаптивностью насекомых к инсектицидам и другим стрессовым факторам внешней среды.

Несмотря на экономическую значимость данных видов вредителей, очень мало сегодня известно о генетической структуре популяций яблонной плодовой и хлопковой совки, что является важным аспектом по созданию стратегии контроля их численности. Проведение молекулярно-генетического анализа популяций *C. pomonella* с использованием кодоминантных маркеров, таких как микросателлиты (SSR, simple sequence repeat) стало возможным благодаря исследованиям последних лет [3,4]. Так, сконструированные французскими учеными для яблонной плодовой SSR-праймеры [4], позволили проанализировать молекулярно-генетическую структуру популяций *C. pomonella* по микросателлитным локусам во Франции [5] и Чили [6].

ПЦР анализ популяций хлопковой совки, *H. armigera*, по микросателлитным локусам стал возможен, благодаря созданию и идентификации специфических для этого вида SSR-маркеров [7-10]. С использованием данных маркеров SSR-анализ хлопковой совки, *Helicoverpa armigera*, проводили исследователи из Индии [11]. В работе индийских авторов была исследована генетическая структура различных популяций *H. armigera*. Авторы обнаружили строгую генетическую дифференциацию популяций насекомых, собранных с различных видов растений.

В задачу наших исследований входила оценка молекулярно-генетического полиморфизма и генетического разнообразия краснодарской популяций хлопковой совки и ряда географических популяций яблонной плодовой по SSR-маркерам.

Методика. Объектом исследований явились выборки из краснодарской популяции хлопковой совки и различных географических популяций яблонной плодовой из Украины (две выборки: г.Киев и

Мелитополь) и России (четыре выборки: гг. Краснодар, Ейск, Ставрополь и Санкт-Петербург). Выделение ДНК из насекомых проводили СТАВ-методом по протоколам описанным нами ранее [12].

SSR-PCR проводили в конечном объеме 12,5 мкл, содержащем 10 mM Tris-HCl, pH 9.0, 50 mM KCl, 3,0 mM MgCl₂, 50 μM каждого dNTP, 0,4μM каждого из праймеров, 0,5 U *Taq* ДНК полимеразы (Диалат ЛТД, Москва) и 10-50 ng ДНК, на термоциклере iCycler (BioRad) с предварительной денатурацией (94⁰C 2 мин) в режиме: денатурация - 94⁰C 30с, отжиг праймера - 58⁰C 40с, элонгация - 72⁰C 40с (35 циклов), конечный синтез - 72⁰C 3 мин.

В SSR-PCR хлопковой совки использовали две пары микросателлитных праймеров HaSSR1 (мотив повтора (TTGC)₂GAT(TGY)₄GAT(TGY)₃₅), HaSSR3 (мотив повтора (TCA)₆) [11]. В ПЦР анализе яблонной плодовой гнили использовали три пары микросателлитных праймеров *Sp1.63* (мотив повтора (GA)₁₉), *Sp2.39* (мотив повтора (TC)₄AC(TC)₁₁) и *Sp2.157* (мотив повтора (GA)₁₀) [4]. Наиболее высокое соотношение нулевых аллелей (более 50%) было отмечено для локуса *Sp2.157*, поэтому он был исключен из дальнейшего анализа.

Продукты SSR-PCR разделяли в 8% полиакриламидном геле (ПААГ), длиной 20 см, толщиной 1 мм, при напряжении 300 В. Визуализацию ампликонов, после предварительного окрашивания бромистым этидием, проводили в УФ на трансиллюминаторе ECX-20.M (Vilber Lourmat). Генетическое разнообразие по Шеннону оценивали в популяциях яблонной плодовой гнили согласно [13], в популяции хлопковой совки - по Nei и Shannon, из пакета компьютерных программ POPGENE 32, version 1.31 (*Francis C.Yeh*).

Результаты.

Результаты ПЦР анализа ДНК хлопковой совки по двум микросателлитным локусам приведены на рисунке 1 и в таблице 1.

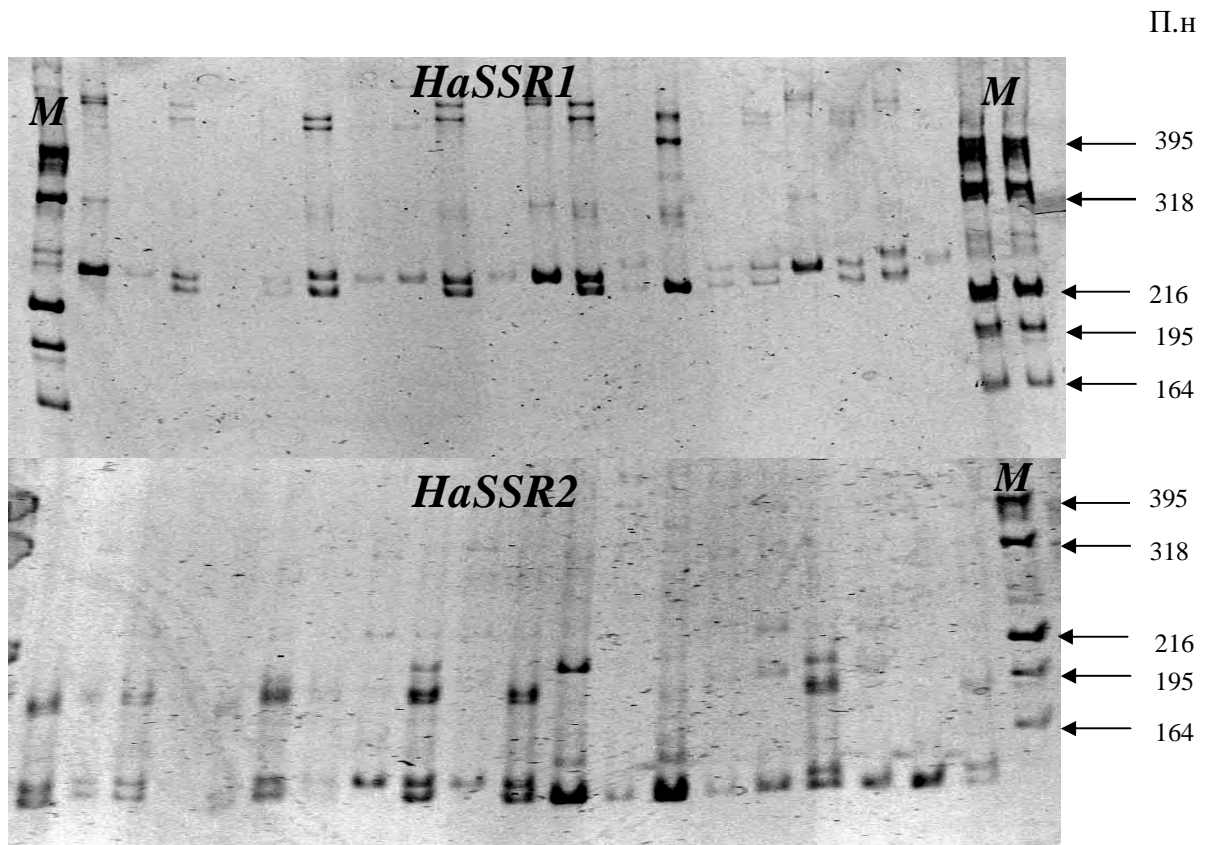


Рисунок 1 – SSR-фенотипы хлопковой совки. Электрофореграмма ампликонов *H. armigera* в 8% ПААГ (ПЦР анализ по двум микросателлитным локусам *HaSSR1* и *HaSSR3*). М-маркеры молекулярных масс, пар нуклеотидов (п.н.).

Таблица 1 – ДНК-полиморфизм и генетическое разнообразие популяции *H. armigera* по двум микросателлитным локусам

Локус	Показатель							
	P	Sr	A	Ar	N	Ht	h	I
<i>HaSSR1</i>	100	230-480	12	2,9	0,05	0,75	0,19 ±0,16	0,32 0,20±
<i>HaSSR3</i>	100	100-220	9	2,7	0,05	0,75	0,23 ±0,17	0,37 ±0,21
Sr – размеры ДНК-фрагментов, п.н. (пар нуклеотидов)								
A – число аллелей								
Ar – обогащенность аллелями (allelic richness) – средняя частота аллелей на особь								
N – доля нулевых гомозигот								
Ht – доля гетерозигот								
h – генетическое разнообразие по Nei (± стандартное отклонение)								
I – индекс Шеннона (± стандартное отклонение)								
P- уровень полиморфизма, %								

Размеры детектируемых ДНК-фрагментов варьировали от 230 до 480 пар нуклеотидов (п.н.) для *HaSSR1* и от 100 до 220 п.н. - для *HaSSR3*. Оба локуса были высоко полиморфны (уровень полиморфизма 100%). Число детектируемых аллелей (вне зависимости от интенсивности ДНК-фрагментов) на локус составило 12 и 9 для *HaSSR1* и *HaSSR3*, соответственно. Доля гетерозигот для обоих локусов была равна 0,75.

Полученные нами данные по генетическому полиморфизму популяции хлопковой совки в целом совпадали с данными полученными ранее на индийских популяциях [11]. Так, в частности, локус *HaSSR1*, выявлял большее количество аллелей, по сравнению с *HaSSR3*.

В то же время полиморфизм индийских популяций *H. armigera* по локусу *HaSSR3* составлял только 50% (против 100% в наших опытах) и было выявлено только 4 аллеля, против 9 по нашим данным, что, вероятно, связано с генетическими особенностями столь географически отдаленных друг от друга популяций.

Молекулярно-генетическую структуру популяции хлопковой совки описывали по частотам встречаемости SSR-маркеров (таблица 2).

Таблица 2 - Частоты встречаемости SSR-маркеров в популяции хлопковой совки

Аллель локуса HaSSR1 (п.н.)	Частота встречаемости	Аллель локуса HaSSR3 (п.н.)	Частота встречаемости
480	0,03	220	0,08
460	0,08	200	0,08
440	0,19	195	0,03
420	0,19	185	0,05
410	0,11	175	0,26
395	0,03	170	0,11
355	0,03	120	0,05
320	0,05	105	0,37
300	0,05	100	0,61
265	0,05		
245	0,55		
230	0,34		

Можно заметить, что из 12 аллелей локуса HaSSR1 наиболее часто встречались аллели 245 и 230 п.н., а локуса HaSSR3 – аллели размером 100 и 105 п.н.

Таким образом, Краснодарская популяция хлопковой совки генотипирована по двум микросателлитным локусам, что может явиться основой для дальнейших генетико-популяционных исследований данного вида насекомых.

Результаты ПЦР анализа ДНК яблонной плодовой гни по двум микросателлитным локусам представлены на рисунке 2. Размеры детектируемых ДНК-фрагментов варьировали от 100 до 370 пар нуклеотидов (п.н.) для *Sp1.63* и от 100 до 480 п.н. - для *Sp2.39*.

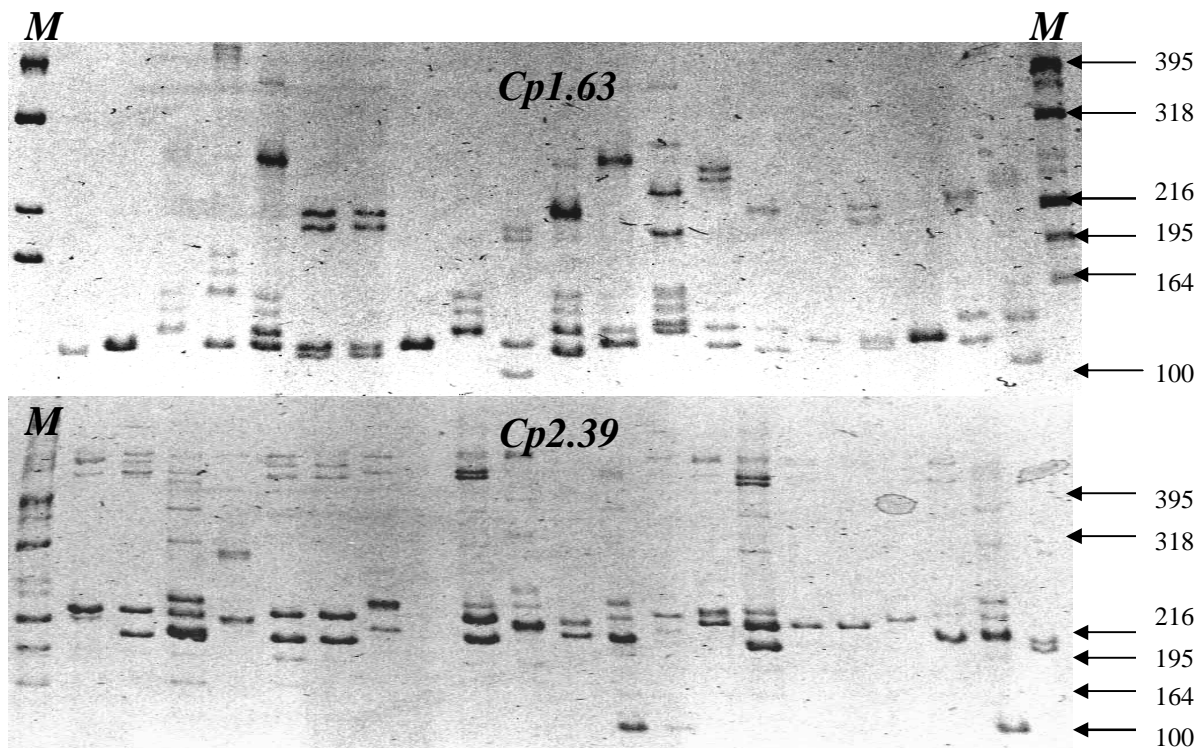


Рисунок 2 – SSR-фенотипы яблонной плодовой жоржки. Электрофореграмма ампликонов *C. pomonella* в 8% ПААГ (ПЦР анализ по двум микросателлитным локусам *Cp1.63* и *Cp2.39*). М-маркеры молекулярных масс, пар нуклеотидов (п.н.).

По всем популяциям в целом, оба локуса были высоко полиморфны (уровень полиморфизма 100%). Среднее количество аллелей на локус составило 2,3 и 3,2 для *Cp1.63* и *Cp2.39*, соответственно. Доля гетерозигот в среднем по всем популяциям для обоих локусов была равна 0,57 (таблица 3).

ПЦР анализ ДНК насекомых из Украины (две выборки: Киев и Мелитополь) и России (четыре выборки: Краснодар, Ейск, Ставрополь и Санкт-Петербург) выявил значительные отличия в молекулярно-генетической структуре популяций *C. pomonella*. Среди выборок из разных стран наиболее гетерогенны были выборки из Украины: в среднем по локусам индекс Шеннона (H) =6,4 и 6,3, для Киева и Мелитополя; и наименьшим генетическим разнообразием характеризовались выборки из России (Ейск и

Таблица 3 – Генетический полиморфизм и генетическое разнообразие в различных выборках из географических популяций *S.pomonella* по двум микросателлитным локусам

Локус	Показатель	Выборка						По всем популяциям
		Краснодар	Ейск	Ставрополь	С.Петербург	Киев	Мелитополь	
Cp.1.63	Sr	110-320	110-310	110-160	100-260	100-370	100-350	100-370
	A	20	11	7	15	30	24	43
	Ar	2,9	1,7	1,0	1,8	3,0	3,2	2,3
	N	0,10	0	0,20	0,15	0,10	0	0,09
	Ht	0,80	0,45	0,10	0,60	0,65	0,80	0,57
	H	4,5	2,9	1,9	3,3	6,3	5,2	4,0
Cp.2.39	Sr	100-460	190-240	200-250	100-460	100-480	100-480	100-480
	A	29	7	16	16	24	25	45
	Ar	4,1	0,9	1,1	1,3	4,3	7,3	3,2
	N	0,05	0,40	0,70	0,25	0,05	0	0,24
	Ht	0,75	0,20	0,20	0,45	0,80	1,00	0,57
	H	7,3	1,7	2,8	3,4	6,4	7,5	4,9
Sr – размеры ДНК-фрагментов, п.н. (пар нуклеотидов)								
A – число аллелей								
Ar – обогащенность аллелями (allelic richness) – средняя частота аллелей на особь								
N – доля нулевых гомозигот								
Ht – доля гетерозигот								
H – генетическое разнообразие по Шеннону (1992)								

Ставрополь, H=2,3 и 2,4, соответственно). Снижение генетического полиморфизма и гетерогенности популяций *S.pomonella* из России, вероятно, связано с большей пестицидной нагрузкой на фруктовые сады.

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

Благодарности: автор выражает искреннюю благодарность д.б.н. О.Д. Ниязову (ВНИИБЗР, г.Краснодар), к.б.н. Л.В. Розовой (институт орошаемого садоводства им.М.Ф. Сидоренко, г.Мелитополь), д.б.н. Т.М. Неверовской (Институт защиты растений УАН, г.Киев), д.б.н. И.Я. Гричанову, к.б.н. Е.И. Овсянниковой (ВИЗР, г.Санкт-Петербург) за предоставленный биоматериал.

Список литературы

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. Vol.99. P.155-163.
2. Endersby, N.M., Hoffmann, A.A., McKechnie, S.W., Weeks, A.R. Is There genetic structure in populations of *Helicoverpa armigera* from Australia? // Entomol. Exp. Appl. 2007. Vol.122. P.253-263.
3. Zhou Y., Gu H., Dorn S. Isolation of microsatellite loci in the codling moth, *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae) // Molecular Ecology Notes. 2005. Vol.5. P.226–227.
4. 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. Vol.5. N 1. P. 99-102.
5. Franck P., Reyes M., Olivares J., Sauphanor B. Genetic architecture in codling moth populations: comparison between microsatellite and insecticide resistance markers // Mol. Ecology. 2007. Vol.16. P. 3554–3564.
6. Fuentes-Contreras E., Espinoza J.L., Lavandero B., Ramírez C.C. Population Genetic Structure of Codling Moth (Lepidoptera: Tortricidae) from Apple Orchards in Central Chile // Journal of Economic Entomology. 2008. Vol.101. N 1. P.190–198.
7. Ji Y.J, Wu Y.C, Zhang D.X. Novel polymorphic microsatellite markers developed in the cotton bollworm *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) // Insect Science. 2005. V.12. P.331 - 334.

8. Ji Y. J., Zhang D. X., Hewitt G. M., Kang L., Li D. M. Polymorphic microsatellite loci for the cotton bollworm *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) and some remarks on their isolation. // *Molecular Ecology Notes*. 2003. Vol. 3. N 1. P. 102-104.
9. Scott, K.D, Lange, C.L, Scott, L.J, Graham, G.C. Isolation and characterization of microsatellite loci from *Helicoverpa armigera*. Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) // *Molecular Ecology Notes*. 2004. V. 4. P.204-205.
10. Tan S, Chen X, Zhang A, Li D. Isolation and characterization of DNA microsatellites from cotton bollworm (*Helicoverpa armigera*. Hübner) // *Molecular Ecology Notes*. 2001. V.1. P.243-244.
11. Subramanian S., Mohankumar S. Genetic variability of the bollworm, *Helicoverpa armigera*, occurring on different host plants // *Journal of Insect Science*, 2006. Vol.6. P.26, available online: insectscience.org/6.26.
12. Киль В.И. Методика оценки ДНК полиморфизма популяций насекомых с помощью ПЦР (RAPD- и ISSR-PCR) // Методические рекомендации. «ООО Просвещение-Юг». Краснодар. 2009. 16 с.
13. Chalmers, K.J., Waugh J.I., Sprent A.J., Simons A.J., Powell W. Detection of genetic variation between and within populations of *Gliricidia sepium* and *G.maculata* using RAPD markers // *Heredity*. 1992. V.69. P.465-472.