

# ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ И ПОЛИМОРФИЗМ ДНК КРАСНОДАРСКОЙ ПОПУЛЯЦИИ ЭКТОПАРАЗИТА *HABROBRACON HEBETOR* SAY

Беседина Е.Н., канд. биол. наук

ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт биологической защиты растений», г. Краснодар

**Аннотация.** Проведен сравнительный RAPD-анализ природной и лабораторной популяций *Habrobracon hebetor*. Предложен новый подход для оценки качества лабораторных популяций *H.hebetor* и других энтомофагов, искусственно выращиваемых для массового выпуска в окружающую среду, как биоагентов в защите растений.

Эктопаразит *Habrobracon hebetor* Say - высокоэффективный паразит гусениц многих видов чешуекрылых вредителей. Энтомофаг является одним из наиболее эффективных регуляторов численности вредоносных видов совок (Noctuidae) и огневков (Pyralidae). Природные популяции габробракона способны снижать численность гусениц кукурузного мотылька до 22 %, огородной совки – до 35 %, хлопковой - до 45 %, совки-гамма - до 30 % [5]. Многие годы энтомофаг является объектом массового разведения и применения против ряда вредных видов чешуекрылых. Биологическая эффективность размноженного в искусственных условиях габробракона при небольших нормах выпуска (1-3 тыс. особей/га) против кукурузного мотылька, хлопковой совки, акациевой огневки достигает 70-90% [1]. Однако, рядом исследователей отмечено, что трофические связи *H. hebetor* значительно варьируют, как в лабораторных, так и в полевых условиях [6]. В связи с этим изучение генетики популяций энтомофага, включая изучение генетического разнообразия и ДНК-полиморфизма *Habrobracon hebetor* позволит установить причины изменчивости структуры популяций габробракона и перспективность его дальнейшего использования для биологического контроля численности ряда вредных чешуекрылых.

Оценку генетического разнообразия популяций насекомых сегодня традиционно проводят с помощью метода ПЦР. Одним из наиболее распространенных является метод RAPD-PCR (randomly amplified DNA polymerase chain reaction) – случайным образом амплифицированная ДНК [7].

Наряду с RAPD-анализом исследователи используют ISSR-PCR для молекулярно-генетического анализа популяций. ISSR-PCR анализ (Inter simple sequence repeats, или межмикросателлитный ПЦР анализ ДНК) вошел в практику молекулярного маркирования с 1994 года [8]. В то же время, по сравнению с RAPD-PCR, преимуществом ISSR-метода является более высокая воспроизводимость результатов, которая достигается за счет большей длины праймера и более высокой температуры отжига. ISSR-маркеры доступны и полиморфны, что делает их, наряду с RAPD-PCR, удобным инструментом для молекулярно-генетического анализа популяций насекомых [3, 4].

Целью исследований было проведение сравнительного молекулярно-генетического анализа лабораторной и природной популяций *H.hebetor* и оценка качества лабораторной популяции по показателям генетического разнообразия и ДНК-полиморфизма. В задачу исследования входило выявление высокоспецифичных RAPD- и ISSR-праймеров к ДНК габробракона, а также RAPD-анализ краснодарских лабораторной и природной популяций этого вида энтомофагов.

Объектом исследования являлись выборки насекомых (n=20) из краснодарских природной и лабораторной популяций *H.hebetor*. Выделение ДНК проводили из особей насекомых (имаго), амплификацию (RAPD- и ISSR-PCR) и электрофорез в 1,8% агарозе - как описано нами ранее [2]. В реакции ПЦР использовали стандартные RAPD-праймеры фирм Operon Technology (OP) и University of British Columbia (UBC). Синтез праймеров осуществлялся фирмой «ЗАО Евроген» (Москва). Уровень ДНК-полиморфизма и оценку внутривидового генетического разнообразия оценивали по Nei иShennon, из пакета компьютерных программ POPGENE version 1.31.

В результате исследований нами было проведено тестирование 38 RAPD- и ISSR-праймеров на специфичность и информативность (таблица 1). Все протестированные праймеры обладали разной степенью специфичности к ДНК *H.hebetor*. Высокоспецифические RAPD-праймеры UBC519 (ACCGGACACT) и GT09 (TCTGCCGTGA) генерировали четкие и ярко выраженные ДНК-фрагменты в гель- электрофорезе при отсутствии пустых треков. В то же время, праймеры со средней специфичностью практически не способствовали выявлению четких и (или) ярко выраженных ДНК-маркеров и (или) имели пустые треки в гель-электрофорезе. Среди ISSR-праймеров мы выявили только один (UBC809) со средней специфичностью, остальные протестированные нами ISSR-праймеры обладали низкой специфичностью. Относительно низкий уровень полиморфизма по большинству праймеров (15-50 %) объяснялся высоким уровнем инбридинга в исследуемой выборке насекомых (поддерживались в лаборатории в течение нескольких лет). Данные праймеры могут быть использованы для оценки внутривидового генетического разнообразия, ДНК-полиморфизма и генетического сходства популяций *H.hebetor*.

Таблица 1

Специфичность RAPD- и ISSR-праймеров к ДНК *H.hebetor*

№	Праймер	Количество полных треков в гель- электрофорезе, %	Яркость и четкость большинства ДНК-фрагментов	Специфичность праймера	ДНК-полиморфизм, %
1	2	3	4	5	6
<b>RAPD-</b>					
1	OPA02	100	удовлетворительно	средняя	30
2	OPA06	0	-	низкая	-
3	OPA07	0	-	низкая	-
4	OPA13	0	-	низкая	-

5	OPA18	0	-	низкая	-
6	OPA15	100	хорошо	средняя	80
7	OPA20	43	хорошо	низкая	15
8	OPB01	100	отлично	высокая	80
9	OPB02	0	-	низкая	-
10	OPB08	0	-	низкая	-
11	OPD03	57	удовлетворительно	низкая	100
12	OPD12	86	хорошо	средняя	100
13	OPE01	0	-	низкая	-
14	OPE07	0	-	низкая	-
15	267/2	100	хорошо	средняя	50
16	GT09	100	хорошо	средняя	60
17	UBC450	100	удовлетворительно	средняя	40
18	UBC519	100	отлично	высокая	30
19	UBC521	100	удовлетворительно	средняя	30
20	UBC531	71	хорошо	средняя	100
21	UBC538	100	удовлетворительно	низкая	50
22	UBC556	100	хорошо	средняя	30
<b>ISSR-</b>					
23	UBC807	0	-	низкая	-
24	UBC808	0	-	низкая	-
25	UBC809	86	удовлетворительно	средняя	100
26	UBC810	0	-	низкая	-
27	UBC811	0	-	низкая	-
28	UBC812	0	-	низкая	-
29	UBC815	0	-	низкая	-
30	UBC816	0	-	низкая	-
31	UBC817	0	-	низкая	-
32	UBC818	0	-	низкая	-
33	UBC822	0	-	низкая	-
34	UBC823	0	-	низкая	-
35	UBC824	0	-	низкая	-
36	UBC826	0	-	низкая	-
37	UBC841	0	-	низкая	-
38	UBC880	0	-	низкая	-

Из протестированных RAPD-праймеров нами был отобран один высокоспецифичный (OPB01), вскрывающий генетический полиморфизм в популяции *H.hebetor*. Данный праймер был использован нами для оценки внутривидового генетического разнообразия и ДНК-полиморфизма природной и лабораторной популяций *H.hebetor* (таблица 2).

ДНК-полиморфизм и генетическое разнообразие краснодарской популяции  
*Habrobracon hebetor*

Популяция	Генетическое разнообразие		ДНК- полиморфизм, P (%)	Генетическое расстояние, GD
	H ± SD*	I ± SD*		
природная	0,3030 ± 0,1288	0,4677 ± 0,1676	95,0	0,33
лабораторная	0,0880 ± 0,1542	0,1380 ± 0,2309	30,0	

\*  $t_{\text{факт}} \geq t_{05}$  – различия достоверны;  
P – % полиморфных локусов в популяции (включая нулевые локусы);  
H – генетическое разнообразие по Nei (1973);  
I – информационный индекс Шеннона;  
GD - генетическое расстояние между выборками;  
± SD – стандартное отклонение.

Высокоспецифический RAPD-праймер OPB01 выявлял в агарозном геле четко выраженные ДНК-фрагменты с общим количеством ДНК-маркеров = 20 и относительно высоким средним числом ДНК-фрагментов на особь = 6,8. Уровень ДНК-полиморфизма для природной популяции составил P = 95 %, а для лабораторной = 30 %. Генетическое разнообразие (индекс Шеннона) составило, соответственно I = 0,47 и 0,14 (различия статистически достоверны), генетическое расстояние между выборками = 0,33.

Как видно более низкий уровень ДНК-полиморфизма и генетического разнообразия у лабораторной популяции *H.hebetor* указывает на высокий уровень инбридинга между насекомыми и объясняется тем, что лабораторная популяция не обновлялась многие годы. Это обусловило то, что лабораторная популяция, в генетическом плане, далеко отстоит от природной (GD=0,33). Это характеризует лабораторную популяцию габробраксона, по этим критериям, как относительно низкого качества. В этой связи для повышения эффективности данной популяции *H.hebetor* мы рекомендуем ее регулярное обновление.

Таким образом, выявлены значительные различия в уровне ДНК-полиморфизма и генетического разнообразия между природной и лабораторной популяциями. Относительно низкий уровень ДНК-полиморфизма и генетического разнообразия лабораторной популяции обусловлен высоким уровнем инбридинга. Для повышения эффективности лабораторной популяции требуется ее обновление.

Данный подход (изучение ДНК-полиморфизма и генетического разнообразия по RAPD-маркерам) можно использовать для оценки качества лабораторных популяций *Habrobracon hebetor* и других энтомофагов, искусственно выращиваемых для массового выпуска в окружающую среду, как биоагентов в защите растений.

## Литература

1. Агасьева И.С. Разработка системы биологической защиты сои от вредителей с использованием энтомоакарифагов / И.С. Агасьева, В.Я. Исмаилов, Е.В. Федоренко, М.В. Нефедова // Материалы VII международной научно-практической конференции «Агротехнический метод защиты растений от вредных организмов» (Краснодар, 15-19 июня 2015). – Краснодар, 2015. - С. 8-11.
2. Киль, В.И. Методика оценки ДНК полиморфизма популяций насекомых с помощью ПЦР (RAPD- и ISSR-PCR) / В.И. Киль // Методические рекомендации. – Краснодар: ООО «Просвещение-Юг», 2009. - 16 с.
3. Киль В.И. ДНК полиморфизм клопов вредной черепашки *Eurygaster integriceps* Put (Hemiptera: Scutelleridae) по межмикросателлитным локусам / В.И. Киль // Наука Кубани. - 2009. - №4. - С. 42-45.
4. Киль, В.И. ПЦР-анализ популяции *Harmonia axyridis* по ISSR-маркерам / В.И. Киль // Наука Кубани. - 2014. - №2. - С. 16-19.
5. Коваленков, В.Г. Биоэкологические особенности бракона / В.Г. Коваленков, Н.М. Тюрина // Защита растений. - 1991. - №7. - С. 17-19.
6. Фролов, А.Н. Плотность размещения и смертность яиц и гусениц младших возрастов кукурузного мотылька на растениях кукурузы / А.Н. Фролов, Ю.М. Малыш // Вестник защиты растений. - 2004. - №1. - С. 42-55.
7. Williams, J.G.K. DNA polymorphism's amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers / J.G.K. Williams, A.R. Kubelik, K.J. Livak et al. // Nucl. Acids Res. - 1990. - V. 18. - P. 6531-6535.
8. Zietkiewicz, E. Genome finger-printing by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification / E. Zietkiewicz, A. Rafalski, D. Labuda // Genetics. - 1994. - V.20. - P. 176-183.