

А. П. Сімчук

Диференціальна життєздатність генотипних класів зеленої дубової листовійки залежно від генотипу кормової рослини

(Представлено академіком НАН України М. А. Голубцем)

The article is focused on the study of the influence of a genetic variation in DNA (RAPD-PCR, primer OPA 14) of oaks (Quercus pubescens L. and Q. petraea L.) on the survival of different Est-4 and Pts-4 genotype classes of the Tortrix viridana larvae. The obtained results show that individuals of the leafroller from the same genotype class may possess the maximal fitness (survival component) on trees of one genotype class and the minimum fitness on trees of another genotype class. The interaction of the “oak genotype” – “leafroller genotype” factors results in a rise of the ties, which are expressed in statistically reliable associations between the leafroller and oak genotype classes. The obtained results are discussed from the point of view of the newly developed field of community or ecosystem genetics and show the genetic-informative role of genoplast in their functioning.

Адаптивна цінність тієї або іншої особини є функцією навколишнього природного середовища, що її оточує. При цьому до поняття „навколишнє природне середовище особини” разом з абіотичними чинниками належать і всі живі організми, що прямо або опосередковано з нею взаємодіють. Живі організми не лише адаптуються до умов середовища, але й, беручи участь у біотичному кругообігу речовин, певним чином змінюють його. Одержані авторами роботи [1] дані вказують на те, що характер та особливості подібних змін значною мірою залежать від генетичної компоненти біотичної складової екосистеми і таким чином підтверджують відому концепцію генопласту [2].

У лісових екосистемах базова роль у формуванні середовища існування більшості видів належить деревним організмам. Генетичні характеристики цих організмів, як виявилось, мають значення для всієї екосистеми. Так, наприклад, генетична мінливість тополі значною мірою визначає варіабельність мінералізації ґрунтового азоту [3], видовий склад і щільність комах, що населяють її, і навіть ефективність впливу на чисельність цих комах з боку птахів [4]. Генетична мінливість дуба голого істотно впливає на кругообіг вуглецю та азоту в екосистемі [5]. Мінливість дуба пухнастого, за RAPD-PCR спектрами, мала вплив на кругообіг деяких важких металів [6]. Все це свідчить про керованість речовинної трансформації з боку керівної підсистеми в екосистемі — генопласта [2].

Очевидно, у генопласті як інтегрованій підсистемі внутрішньовидова генетична мінливість одного виду може робити певний внесок у формування умов існування інших видів, що знаходяться у сфері його впливу. Це значить, що на пристосованість різних генотипів кожного виду в угрупованні може впливати генетична мінливість інших видів, що взаємодіють з ним.

Одним з компонентів природного добору, за яким можна оцінити пристосованість генотипів, є диференціальна життєздатність. В якій мірі життєздатність личинок зеленої дубової листовійки в період від першого до п'ятого віків співвідноситься з її генетичною

компонентою, а в якій — з генетичною мінливістю дуба — предмет дослідження і обговорення в цьому повідомленні.

Матеріал та методи досліджень. Дослідження проводили в травні 2004 р. в природній популяції зеленої дубової листовійки (*Tortrix viridana* L.) на постійній пробній площі “Лаврове”, розташованій на Південному березі Криму неподалік від с. Лаврове, на північ від Ведмідь-гори. Як модельні було обрано сім дерев дуба пухнастого (*Quercus pubescens* Willd.) і три дерева дуба скельного (*Q. petraea* Matuschka/Liebl).

За матеріал використовували гусеницю зеленої дубової листовійки першого (L1) і п'ятого (L5) віків, а також листя дуба, зібране з кожного модельного дерева. Комахи і листя були заморожені сухим льодом і зберігалися до використання в морозильній камері ($t = -20\text{ }^{\circ}\text{C}$).

За допомогою процедури диск-електрофорезу [7] виявляли належність особин листовійки до генотипних класів за локусами, що кодуєть карбоксилестеразу (локус Est-4) і протеазу (локус Pts-4). Детальний опис цих локусів і процедури їх аналізу проводився раніше (Simchuk, 1999). Аналіз генетичної мінливості личинок першого (L1) і п'ятого (L5) віків дозволяє простежити диференціальну життєздатність генотипних класів у цей період розвитку комахи.

Зразки ДНК екстрагували з $0,5\text{ см}^2$ свіжого листя дубу. Екстракцію тотальної ДНК проводили, згідно із стандартною методикою [8]. Для дослідження поліморфізму методом RAPD-PCR використовували праймери OPA 1, OPA 8 і OPA 14 (Oregon Technologies, USA).

RAPD-PCR проводили в реакційній суміші об'ємом 25 мкл на термоциклері “Терцик” (ДНК-технологія, Росія) з використанням реактивів для полімеразної ланцюгової реакції GenePak™ PCR Universal (ІзоГен, Москва). Ампліфікація відбувалася в такому режимі: 1 цикл денатурації $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ протягом 5 хв і подальші 45 циклів за схемою: $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ — 1 хв, $36\text{ }^{\circ}\text{C}$ — 1 хв, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ — 2 хв; термінальна стадія синтезу при $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ — 10 хв.

Продукти ампліфікації розділяли за допомогою електрофорезу в 1,8%-му агарозному гелі і після фарбування бромистим етідієм аналізували під ультрафіолетом [8]. Як маркери маси використовували DNA-markers M 100 (ІзоГен, Москва) з довжиною фрагментів пар нуклеотидів: 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 і 1000.

Для математичної обробки отриманих результатів застосовували стандартні статистичні процедури з використанням можливостей програми MS Excel-XP.

Відносну життєздатність личинок зеленої дубової листовійки оцінювали за змінами частот генотипних класів у період зі стадії личинки першого віку (L1) до стадії личинки п'ятого віку (L5). Показником було відношення частоти генотипу личинок першого віку до його частоти личинок п'ятого віку, при цьому найбільше значення відношення для локусу приймалося за одиницю.

Результати та їх обговорення. Для оцінки генетичного поліморфізму модельних дерев дуба використовували методику виявлення випадково ампліфікованої поліморфної ДНК (RAPD). Застосування стандартного праймера OPA 14 дозволило отримати в сукупності 11 RAPD-маркерів (рис. 1). Слід зазначити, що використання двох інших праймерів OPA 1 і OPA 8 не призвело до виявлення чіткої картини стійкого поліморфізму, і в подальшому вони були відкинуті. Таким чином, досліджені RAPD-маркери (OPA 14) хоча і не є видоспецифічними, але дозволяють аналізувати вибірку у цілому на предмет поліморфізму.

У табл. 1 наведені результати двофакторного дисперсійного аналізу життєздатності личинок зеленої дубової листовійки залежно від їх генотипів і генотипу кормової рослини, на якій вони існували. Вони свідчать, що у ряді випадків життєздатність листовійки залежала від генотипу кормової рослини, а іноді — від генотипу самої листовійки.

Таблиця 1. Результати двофакторного дисперсійного аналізу мінливості відносної життєздатності личинок зеленої дубової листовійки залежно від їх генотипів та наявності або відсутності ДНК фракцій ОРА 14-4 й ОРА 14-9 у RAPD-PCR спектрі листя кормової рослини

Варіації	d. f.	Суми квадратів	Середні квадрати	<i>F</i>	Внесок фактора	d. f.	Суми квадратів	Середні квадрати	<i>F</i>	Внесок фактора
Генотипи локусу Est-4 листовійки (ОРА 14-4)						Гетеро-гомозиготи в локусі Est-4 листовійки (ОРА 14-9)				
Генотип дерева	1	0,38	0,38	3,98	0,077	1	0,0052	0,0052	0,22	0,009
Генотип листовійки	4	0,19	0,05	0,51	0,039	1	0,0015	0,0015	0,06	0,003
Взаємодія	4	1,05	0,26	2,76*	0,212	1	0,2259	0,2259	9,61**	0,402
Залишкова	35	3,34	0,10	—	0,673	14	0,3291	0,0235	—	0,586
Загальна	44	4,97	—	—	—	17	0,5616	—	—	—
Генотипи локусу Est-4 листовійки (ОРА 14-4)						Гетеро-гомозиготи в локусі Est-4 листовійки (ОРА 14-9)				
Генотип дерева	1	0,075	0,075	0,85	0,026	1	0,14	0,14	6,54*	0,132
Генотип листовійки	2	0,338	0,169	1,92	0,117	1	0,49	0,49	22,47**	0,454
Взаємодія	2	0,623	0,312	3,54*	0,216	1	0,14	0,14	6,54*	0,132
Залишкова	21	1,848	0,088	—	0,641	14	0,30	0,02	—	0,283
Загальна	26	2,884	—	—	—	17	1,07	—	—	—

* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$.

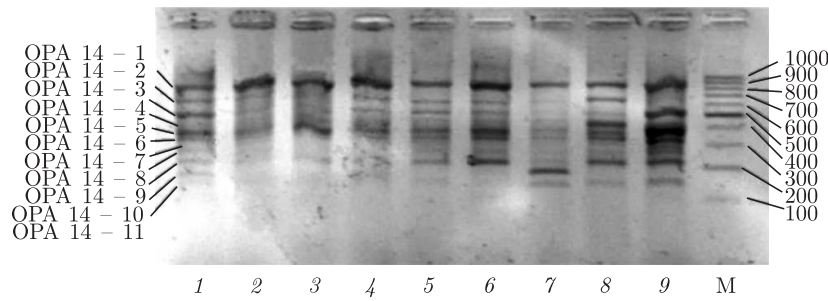


Рис. 1. Електрофоретичні спектри ампліфікованих фрагментів ДНК дерев дуба пухнастого (1–6) і скельного (7–9) з праймером OPA 14 (1–11 – фрагменти ДНК); М – маркери молекулярних мас від 100 до 1000 п. н.

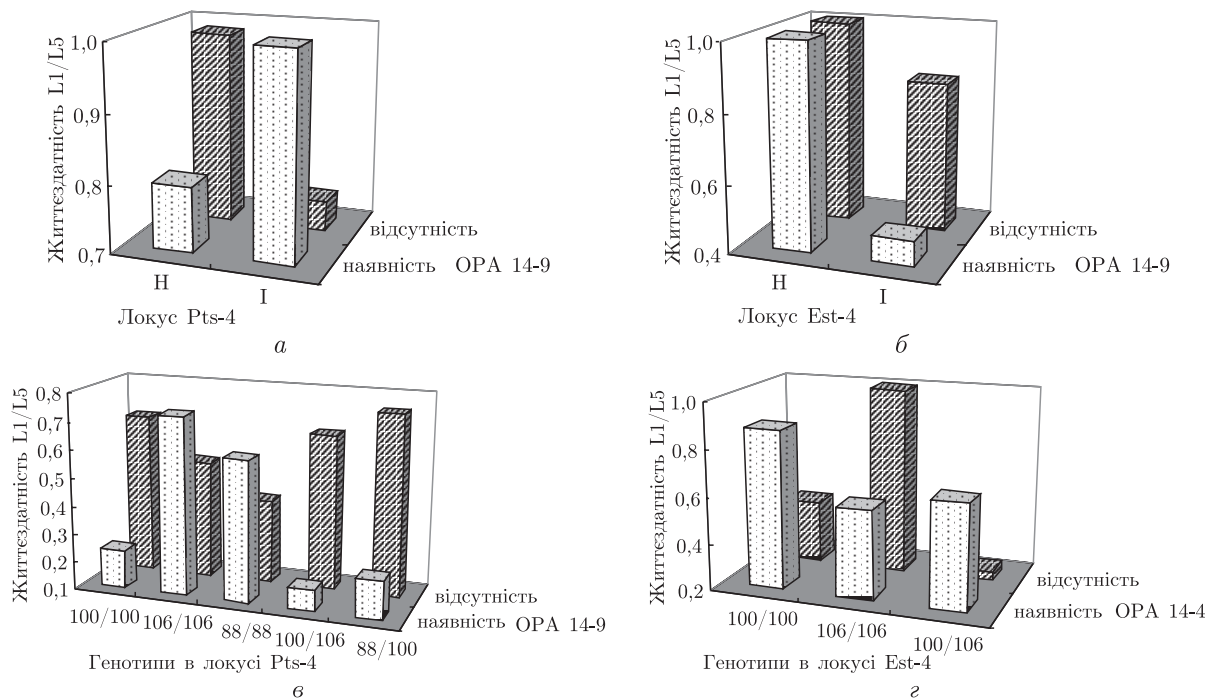


Рис. 2. Значення життєздатності личинок зеленої дубової листовійки в період з першого (L1) до п'ятого (L5) віку залежно від їх генотипів за локусами Est-4 й Pts-4 та наявності або відсутності ДНК фракцій OPA 14–4 та OPA 14–9 у RAPD-PCR спектрі листя кормової рослини; Н – гетерозиготи; І – гомозиготи

При цьому найбільший інтерес викликають варіанти, для яких встановлена достовірна взаємодія факторів. Слід зазначити, що від 13 до 40% загальної мінливості життєздатності личинок листовійки в період від першого до п'ятого віків належить до сумісного впливу генотипу комахи і генотипу дуба (див. табл. 1).

Статистично значуща взаємодія факторів вказує на те, що особини листовійки одного й того самого генотипу можуть мати максимальні значення ознаки на дубах одного генотипу і мінімальні – на дубах іншого генотипу. Дані, що наведені на рис. 2, підтверджують це припущення. Личинки листовійки, гомозиготні в локусі Pts-4, мали максимальні значення життєздатності на дубах, що містять фракцію ДНК OPA 14–9, завдовжки близько 210 п. н., і мінімальні – на дубах без цієї фракції, а для гетерозиготних личинок була притаманна протилежна картина (див. рис. 2, а).

Для естеразного локусу встановлена зворотна тенденція: життєздатність гомозигот на дубах з фракцією ДНК ОРА 14–9 у RAPD-PCR спектрі була значно нижчою, ніж на дубах без цієї фракції (рис. 2, б). Аналогічні закономірності притаманні і для окремих генотипічних класів у локусах Pts-4 (рис. 2, в) і Est-4 (рис. 2, з).

З теоретичної точки зору, встановлені статистичні закономірності можуть бути наслідком селективних процесів (що проходять у мікропопуляціях зеленої дубової листовійки), зокрема, зумовлених генетичним фактором кормової рослини. Очевидно, що подібні відмінності у життєздатності генотипних класів листовійки на деревах різних генотипів повинні призводити до виникнення статистично достовірних асоціацій між відповідними генотипами листовійки і дуба. Емпіричні результати аналізу, що підтверджують такі асоціації генотипів, надані в табл. 2. Статистично достовірні асоціації підтверджують результати аналізу життєздатності листовійки стосовно генотипів Pts-4^{88/88}, Pts-4^{88/100} (рис. 2, в), а також гомозигот у локусі Pts-4 (рис. 2, а) і гетерозигот у локусі Est-4 (рис. 2, б).

Для будь-якої з популяцій у біогеоценозі найвпливовішим, безпосередньо важливим чинником є кормові ресурси [9]. Як було показано раніше, ціла низка показників деревного організму впливає на генотипний склад мікропопуляцій зеленої дубової листовійки [10]. Це було доказом на користь припущення про значну роль селективних процесів, зумовлених деревом, у підтриманні генетичної мінливості листовійки.

Проте в цьому повідомленні розглядаємо не стільки проблему селективності білкового та ДНК поліморфізму, скільки питання про роль генетичної інформації у взаємодії видів, що утворюють угруповання. А точніше, питання, наскільки мінливість одного виду угруповання впливає на селективні процеси і пристосованість різних генотипів інших видів, тобто, по суті, розглядається генетична інтегрована система генопласта.

Як виявилось, личинки одного і того самого генотипного класу можуть мати різну відносну пристосованість залежно від генотипу кормової рослини, на якій вони існують. Наприклад, гомозиготи в локусі Pts-4 мали найбільшу пристосованість (компонент, пов'язаний з життєздатністю личинок) на дубах, що містять фракцію ДНК ОРА 14–9, і були найменш пристосованими на дубах, у яких ця фракція відсутня. Таким чином, між генофондами дуба і листовійки існує певна відповідність, зв'язок, або, як пише М. А. Голубець [2], “припасування”.

В останні кілька років у відповідній літературі з'явилися роботи, в яких приділяється увага дослідженню ролі генетичної інформації у регуляції функціонування екосистем [2, 3, 9]. Деякі автори запропонували виділити новий напрям у генетиці, який вони назвали генетикою угруповань або екосистем, і дискусії з цієї проблеми був присвячений спеціальний випуск журналу *Ecology* (V. 84 (3), 2003). Деякі з положень, що обговорювалися, такі, на-

Таблиця 2. Статистично значущі асоціації між генотипами зеленої дубової листовійки і ДНК фракцією ОРА 14–9 з листя дуба

Локус листовійки	Генотип листовійки	Коефіцієнт асоціації Персона	χ^2
Est-4	100/120	0,190	3,98*
	Гетерозиготи	0,255	8,67**
Pts-4	88/100	-0,185	4,09*
	88/88	0,240	7,06**
	Гомозиготи	0,290	11,53**

* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$.

приклад, як успадкованість на рівні екосистем та екосистемний добір, викликають скептичне відношення. Інші, такі як концепція розширеного фенотипу (extended phenotype), у розумінні внутрішньовидової генетичної мінливості, що має екосистемні наслідки, — більш цікаві. В цілому ж складається враження відсутності чітко означеного предмету досліджень.

Генетика, мабуть, одна з небагатьох, якщо не єдина біологічна дисципліна, яка вивчає практично всі рівні організації життя. На кожному з цих рівнів вивчається певна генетична система: ген, хромосома, генотип особини, генофонд популяції. Очевидно, що новий напрям може одержати право на існування у тому випадку, якщо він має предметом вивчення генетичну систему, відмінну від перелічених. На роль такої системи, як згадувалося вище, претендує генопласт [2, 9].

Як відомо, одним з основних критеріїв при виділенні будь-якої системи є наявність зв'язків між елементами. Отримані в роботі факти демонструють наявність зв'язків між генофондами двох взаємопов'язаних в екосистемі видів. Пристосованість генотипів листовійки залежить від генетичної структури популяції дуба. Зміна цієї структури неминуче зумовлює відповідні зміни в генофонді комахи. Вплив генетики листовійки на генофонд дуба менш явний. Проте й він, імовірно, має місце, оскільки значні втрати листя від листогриза можуть призводити до усихання в першу чергу дубів певних генотипів. По-друге, втрата листя призводить до зменшення репродукції дерев і, отже, до зниження пристосованості відповідних генотипів дуба.

Таким чином, спираючись на одержані дані й результати інших дослідників, можна констатувати, що біотичне угруповання дійсно має “свою” генетичну пам'ять, свою генетичну систему, між елементами якої (особинами різних генотипів різних видів) відбуваються стохастичні взаємодії. Встановлені статистично достовірні асоціації підтверджують точку зору, згідно з якою генопласт являє собою стохастичні асоціації генофондів взаємопов'язаних в угрупованні популяцій [9].

Динаміка такої системи не може бути описана засобами генетики популяцій, так само як і не придатні для цього такі популяційно-генетичні поняття, як успадкованість або природний добір. До речі, останні деякі автори намагаються використовувати в описанні генетики надпопуляційних структур [1, 4]. Генопласт — новий рівень в ієрархічній системі організації генетичного матеріалу, і його дослідження та опис вимагають формування бази специфічних понять і підходів.

Генотип кормової рослини істотно впливає на диференціальну життєздатність личинок зеленої дубової листовійки; до 40% її загальної мінливості належить до взаємодії факторів “генотип дуба” — “генотип листовійки”. Особини зеленої дубової листовійки одного й того ж генотипного класу можуть мати максимальну пристосованість до дерев відповідного генотипу і мінімальну — до дерев інших генотипів. Взаємодія факторів “генотип дуба” — “генотип листовійки” призводить до виникнення зв'язків, які втілюються в статистично достовірних асоціаціях між генотипами листовійки і генотипами дуба. Встановлені статистично достовірні асоціації генотипів — представників різних видів в угрупованні підтверджують правильність концепції генопласта, як нового рівня організації генетичного матеріалу, заснованого на інтеграції генофондів популяцій, що взаємодіють в угрупованні.

1. *Whitham T. G., Young V., Martinsen G. D. et al.* Community genetics: a consequence of extended phenotype // *Ecology*. – 2003. – **84**. – P. 559–573.
2. *Голубець М. А.* Екосистемологія. – Львів: Поллі, 2000. – 316 с.
3. *Schweitzer J. A., Bailey J. K., Rehill B. J. et al.* Genetically based trait in a dominant tree affects ecosystem processes // *Ecology Lett.* – 2004. – **7**. – P. 127–134.

4. *Bailey J. K., Wooley S. C., Lindroth R. L., Whitham T. G.* Importance of species interactions to community heritability: a genetic basis to trophic-level interactions // *Ibid.* – 2006. – **9**. – P. 78–85.
5. *Madritch M. D., Hunter M. D.* Phenotypic diversity influences ecosystem functioning in an oak sandhills community // *Ecology.* – 2002. – **83**. – P. 2084. – 2090.
6. *Савушкіна І. Г., Оберемок В. В., Симчук А. П.* Содержание некоторых тяжелых металлов в листьях дубов, маркированных по случайно амплифицированной полиморфной ДНК // *Экосистемы Крыма, их оптимизация и охрана.* – Симферополь: Таврій. нац. ун-т, 2004. – С. 24–29.
7. *Гааль Е., Медьеші Г., Верецкеи Л.* Электрофорез в разделении биологических макромолекул. – Москва: Мир, 1982. – 642 с.
8. *Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T.* *Molecular Cloning: Laboratory Manual.* – New York: Cold Spring Harbour Univ. Press, 1989. – 1626 p.
9. *Івашиов А. В.* Консортивні зв'язки зеленої дубової листовійки (*Tortrix viridana* L.): теоретичні і прикладні аспекти: Автореф. дис. . . . д-ра біол. наук. – Дніпропетровськ, 2001. – 32 с.
10. *Simchuk A. P., Ivashov A. V., Companiytsev V. A.* Genetic patterns as possible factors causing population cycles in oak leafroller moth, *Tortrix viridana* L. // *Forest Ecology and Management.* – 1999. – **113**. – P. 35–49.

*Таврійський національний університет
ім. В. І. Вернадського, Сімферополь*

Надійшло до редакції 03.01.2007