

На правах рукописи

КОНОНЧУК

Анастасия Геннадьевна

**ЭКОЛОГО-ГЕОГРАФИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА ПОПУЛЯЦИЙ
СТЕБЛЕВЫХ МОТЫЛЬКОВ И ФАКТОРЫ
ЕЕ ОПРЕДЕЛЯЮЩИЕ**

Шифр и наименование специальности –
03.02.05- Энтомология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Санкт-Петербург - Пушкин
2013

Работа выполнена в Государственном научном учреждении Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений Российской академии сельскохозяйственных наук (ГНУ ВИЗР Россельхозакадемии)

Научный руководитель: **Фролов Андрей Николаевич**
доктор биологических наук, профессор

Официальные оппоненты: **Радченко Евгений Евгеньевич**
доктор биологических наук,
зав. отделом генетики ГНУ ВНИИ
Растениеводства им. Н.И. Вавилова
Россельхозакадемии

Фасулати Сергей Радиевич,
кандидат биологических наук,
ведущий научный сотрудник ГНУ ВНИИ
защиты растений Россельхозакадемии

Ведущая организация: **Российский государственный аграрный университет - Московская сельскохозяйственная академия имени К. А. Тимирязева**

Защита диссертации состоится «25» апреля 2013 года в 10 часов на заседании диссертационного совета Д 006.015.01 на базе Всероссийского научно-исследовательского института защиты растений по адресу: 196608, Санкт-Петербург, Пушкин, шоссе Подбельского, д.3.

Факс: (812) 4705110; e-mail: vizrspb@mail333.com,

Web-сайт: www.vizrspb.narod.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Всероссийского научно-исследовательского института защиты растений.

Автореферат разослан «__» марта 2013 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Наседкина Галина Анатольевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. Знание экологических и генетических особенностей микроэволюции необходимо для успешного управления популяциями вредителей и экосистемами в целом, прогноза размножений и вредоносности экономически значимых объектов, а также для селекции устойчивых к вредителям сортов. Изучению популяционной структуры стеблевых мотыльков посвящено немало работ, выполненных в разных странах. Известно, что род *Ostrinia* включает в себя комплекс близкородственных и трудноразличимых, генетически обособленных видов и форм с гостальной пищевой специализацией. Так, на территории Европейской части России, кукурузный мотылек *Ostrinia nubilalis* Hbn. приурочен к питанию на кукурузе, щетконогий или конопляный мотылек *O. scapularis* Wlk., обитая на Северном Кавказе, выкармливается главным образом на конопле и дурнишнике (Фролов, 1979), а в Украине заселяет более широкий круг видов растений, в т.ч. хмель и циклахену дурнишниковидную (Шапиро и др., 1979; Фролов, 1989). Известно, что популяции стеблевых мотыльков, обитающих на двудольных видах растений-хозяев, полиморфны и морфологически (по строению голеней средних ног самцов) разнообразны, зачастую трудно или вообще неотличимы от популяций, обитающих на кукурузе, т.е. кукурузного мотылька. В такой ситуации актуально применение современных молекулярно-генетических подходов, позволяющих осуществлять диагностику и анализ трофических связей у насекомых на новом методологическом уровне.

Цель данной работы — изучить характер изменчивости популяционной структуры стеблевых мотыльков в связи с физико-географическими и трофическими факторами в целях уточнения диагностики и прогноза динамики численности вредителя.

В соответствии с поставленной целью решались следующие **задачи**:

- генотипирование энтомологического материала, собранного в европейской и азиатской частях России с разных кормовых растений и оценка генетической дивергенции популяций насекомых методами молекулярной биологии;
- проведение анализа популяционной структуры в связи с гостальной пищевой специализацией и оценка степени генетической дифференциации насекомых по способности развиваться на кукурузе;
- уточнение видового состава патогенных микроорганизмов, способных оказывать влияние на динамику численности фитофага;
- сравнительная оценка роли географического и пищевого факторов в дифференциации популяций стеблевых мотыльков.

Научная новизна. Впервые для России с помощью молекулярно-биологических маркеров изучена структура популяций стеблевых мотыльков в связи с пищевым и географическим факторами. При использовании ПЦР - диагностики уточнен круг патогенных микроорганизмов стеблевых мотыльков. Впервые в России обнаружено заражение стеблевых мотыльков микроспоридиями и показано широкое распространение патогена в Краснодарском крае. Произведена сравнительная оценка выживаемости европейских и восточноазиатских популяций мотыльков рода *Ostrinia* в зависимости от гостальной пищевой специализации, а также определено влияние локализованного в половой хромосоме гена *invagination* на способность гу-

сениц стеблевых мотыльков выживать на кукурузе.

Теоретическая и практическая значимость. Получены новые сведения относительно эколого-географической структуры популяций стеблевых мотыльков. Благодаря использованию молекулярно-биологического анализа получены новые данные о генетической структуре популяций в европейской части России и Казахстане. Определена ведущая роль кормового растения как фактора, влияющего на популяционную структуру стеблевых мотыльков. Уточнен и расширен круг патогенных микроорганизмов, оказывающих влияние на динамику численности *Ostrinia* spp. в России.

Основные положения, выносимые на защиту:

- Развитие представлений о генетической структуре популяций стеблевых мотыльков в связи с их пищевой специализацией благодаря использованию микросателлитного анализа участков неэкспрессируемой ДНК.
- Положение о ведущей роли кормового растения как средообразующего фактора для видов рода *Ostrinia* (переход стеблевых мотыльков на питание кукурузой не только в Европе, но и в Азии сопровождался формированием пищевой специализации).
- Расширение знаний о патогенных микроорганизмах, способных заражать стеблевых мотыльков и уточнение представлений об особенностях динамики численности насекомых, обитающих в восточной и западной частях Краснодарского края на предпочитаемых кормовых растениях.

Апробация работы. Результаты работы представлены на IV Международном конгрессе «Зерно и хлеб России» (СПб, 2008), на второй Международной научно-практической интернет-конференции «Актуальные вопросы энтомологии» (Ставрополь, 2009), на семинаре Лаборатории эволюции и биоразнообразия университета П. Сабатье, (г.Тулуза, Франция, 2009), на международной молодежной конференции «Инфекционная патология членистоногих» (СПб-Пушкин, 2012), на Ежегодной отчетно-плановой сессии ученого совета ВИЗР (СПб-Пушкин, 2013).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 7 работ, из них 2 в изданиях из перечня научных журналов и изданий, рекомендованных ВАК РФ.

Структура и объём работы. Диссертационная работа изложена на 130 страницах машинописного текста, состоит из введения, 3 глав, выводов, практических рекомендаций и приложения. Работа иллюстрирована 21 таблицами и 34 рисунками. Список литературы включает 170 источников, из них 75 на иностранных языках.

Работа выполнялась в 2008 – 2011 гг. во время обучения в очной аспирантуре ГНУ ВИЗР Россельхозакадемии при частичной финансовой поддержке грантов Российского фонда фундаментальных исследований (РФФИ) № 06-04-48265, № 07-04-92170, № 09-04-00619 и № 12-04-32119.

Автор выражает глубокую признательность и благодарность научному руководителю проф. доктору биологических наук Андрею Николаевичу Фролову за постоянную помощь, ценные методические советы и научные консультации в период проведения и написания диссертационной работы. Благодарит Ю.М. Малыш и Ю.С. Токарева за поддержку и помощь в проведении работы и сборе энтомологического материала, весь коллектив лаборатории фитосанитарной диагностики и прогнозов за поддержку и советы. Искреннюю признательность автор выражает проф. Н.А. Вилковой за ценные консультации и помощь, оказанную при оформлении работы, до-

центу Г.Р. Леднёву за помощь при работе с грибами из рода *Beauveria*, В.Б. Митрофанову за помощь в определении бакуловирусных инфекций. Выражает благодарность коллективам Кубанской опытной станции ВИР, под руководством доктора с.-х. наук Г.А. Техановича, и НПО КОС-МАИС, под руководством кандидата с.-х. наук В.Г. Гаркушки, за всестороннюю помощь в период проведения летних полевых работ. Особую признательность автор выражает ученым из университета им. П. Сабатье г. Тулузы, лаборатории эволюции и биоразнообразия, в частности S Ponsard, и сотрудникам CBGP (Centre de Biologie pour la Gestion des Populations, г. Монпелье), а именно D Bourguet, P. Audiot, R. Streiff, A. Dalecky, T. Malausa, S. Meusnier.

СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИИ

Глава 1. Популяционная структура стеблевых мотыльков и факторы, её определяющие

В главе приводится анализ литературных данных, посвященный систематике, распространению, пищевой специализации и методам диагностики популяционной структуры и изменчивости стеблевых мотыльков.

Глава 2. Условия, материал и методы исследований

Материалом для диссертационной работы служили популяции стеблевых мотыльков собранные в нескольких районах Краснодарского края, насекомые из Забайкальского края, Иркутской и Амурской обл., республик Татарстан, Удмуртия, Бурятия и Алмаатинской обл. (Казахстан).

Молекулярно-биологический анализ проводили в несколько этапов: пробоподготовка, экстракция ДНК (Sambrook *et. al.*, 1989), диагностика на основе ПЦР (амплификация ДНК), секвенирование (нуклеотидные последовательности определены на автоматическом секвенаторе AbiPrism).

Для просмотра, редактирования и первичного анализа исходных нуклеотидных последовательностей использовали – программу BioEdit (Hall, 1999), выполненную в формате User-Friendly Interface for Windows.

Филогенетический анализ выполняли с помощью Байесовского заключения в MrBayes 3.1.2 (Ronquist, Huelsenbeck, 2003). Выходные данные конвертировали в программе TreeView 1.6.6. Кроме Байесовского кластерного анализа, структурирование генотипированного материала оценивали с помощью программного продукта Structure (Pritchard *et al.*, 2000) версии 2.3.1. (Hubisz *et al.*, 2009).

Степень генетической дифференциации пар популяций по всем локусам оценивали точным методом Фишера по программе Genepop 3.4 (Raymond, Rousset, 1995). Оценки значений P для множественных сравнений корректировали поправкой Bonferroni. Для статистической обработки данных использовали компьютерное приложение Statistica ver. 8.0.

Учёты численности стеблевого мотылька проводили на полях Кубанской опытной станции ВИР и НПО КОС-МАИС (п. Ботаника, Гулькевичский р-н, Краснодарский край). Осуществляли учеты перезимовавших гусениц (на полях, занятых кукурузой в предыдущем году); учеты плотности отложенных на кукурузе яиц (на фиксированных модельных площадках); учеты плотности и смертности яиц (в период лёта имаго); учеты плотности гусениц на растениях. Учитываемые факторы

смертности: энтомофаги, поздняя эмбриональная смертность, отпадение кладки яиц от листа. Смертность гусениц младших (1-2) возрастов оценивали по разности между плотностью яиц со следами отрождения гусениц и плотностью гусениц, определенной при вскрытии растений по завершении периода откладки яиц. В качестве средних значений плотности яиц и гусениц стеблевых мотыльков за сезон использовали средневзвешенные оценки по учетным площадям посевов. По результатам учетов составляли таблицы выживаемости, которые анализировали на основе известных принципов (Morris, 1959; Varley, Gradwell, 1970; Nagai, Rogers, 1975; Royama, 1996; Huffaker et al., 1998).

При анализе результатов в работе использовались данные, полученные сотрудниками лаборатории в предыдущие годы (период 1994-2007 гг.).

Искусственное заселение на кукурузу проводили в 2009-2011 гг. на опытных участках г. Темрюк. Для этого насекомые, собранные в естественных условиях, после перезимовки были реактивированы и разводились в лаборатории на искусственной питательной среде в 2-х поколениях (Шапиро и др., 1980). Заселение растений проводили яйцами в стадии черной головки или только что отродившимися гусеницами, предварительно подсчитав их количество. Через 30 дней после заселения, растения срезали и вскрывали, выживших гусениц помещали в стеклянные сосуды для дальнейшего развития.

Глава 3. Результаты исследований

3.1. Анализ микросателлитной ДНК популяций стеблевого мотылька

Генотипирование осуществлялось с помощью набора из 8 аутомомных локусов, отобранных из ранее использованных 11 локусов (Malausa et al., 2007), описанных в публикациях А. Dalecky et al. (2006) и К. Kim et al. (2008). Так же, в набор включили идентифицированный В.С. Coates (USDA) локус Ga54.

Таблица - 1 Микросателлитные локусы, число аллелей (N), статистическая достоверность (значения F_{IS} и P) отклонений оценок гетерозиготности от ожидаемых согласно уравнению равновесия Харди-Вайнберга, средние оценки частот нулевых аллелей (в скобках – стандартное отклонение) по результатам изучения популяций, собранных на кукурузе и полыни (хмеле, конопле) в России и Казахстане. n.s.: статистическая значимость не доказана; * : $0.01 < P < 0.05$; **: $0.001 < P < 0.01$; ***: $P < 0.001$

Локус	Кукуруза				Полынь/конопля			
	N	F_{IS}	P	Частота нулевых алл.	N	F_{IS}	P	Частота нулевых алл.
<i>Ga54</i>	8	0.064	n.s.	0.02 (0.02)	9	0.291	***	0.08 (0.09)
<i>OnT2</i>	10	0.603	***	0.23 (0.04)	20	0.532	***	0.20 (0.08)
<i>OnT3</i>	9	0.317	***	0.13 (0.05)	12	0.340	***	0.14 (0.10)
<i>D145</i>	13	0.047	*	0.02 (0.05)	12	0.013	n.s.	0.02 (0.03)
<i>D243</i>	12	-0.049	n.s.	0.00 (0.00)	13	-0.008	n.s.	0.01 (0.02)
<i>D63</i>	11	0.190	***	0.09 (0.06)	18	0.202	***	0.08 (0.06)
<i>D65</i>	16	0.230	***	0.09 (0.04)	20	0.378	***	0.16 (0.09)
<i>T81</i>	26	0.164	***	0.05 (0.03)	27	0.243	***	0.10 (0.05)
Все локусы	-	0.233	***	-	-	0.275	***	

В процессе проведения статистического анализа результатов генотипирова-

ния вносили поправку в F_{ST} на эффект нулевых аллелей согласно алгоритму M.P. Chapuis, A. Estoup (2007). Степень генетической дифференциации пар популяций по всем локусам оценивали методом Фишера по программе Genepop 3.4 (Raymond, Rousset, 1995). Оценки значений P для множественных сравнений корректировали поправкой Bonferroni (Гланц, 1999) (табл. 1).

Эффект изоляции расстоянием (ИР) характеризовали зависимостью географических (измеренных в \ln) и генетических расстояний ($F_{ST}/(1-F_{ST})$) внутри и между группами популяций, собранных на кукурузе и двудольных кормовых растениях в соответствии с методикой (Rousset, 1997). Нулевая гипотеза независимости генетических и географических расстояний тестировалась в противовес альтернативной гипотезе положительной корреляции, что ожидалось в случае достоверности эффекта ИР. Данный эффект также тестировали с помощью программы Genepop.

Полученные для Казахстана и европейской части России результаты соотносятся с таковыми полученными ранее во Франции (Malausa et al., 2007), и свидетельствуют, что фактор кормового растения оказывает определяющее воздействие на генетическую структуру насекомых (рис. 1).

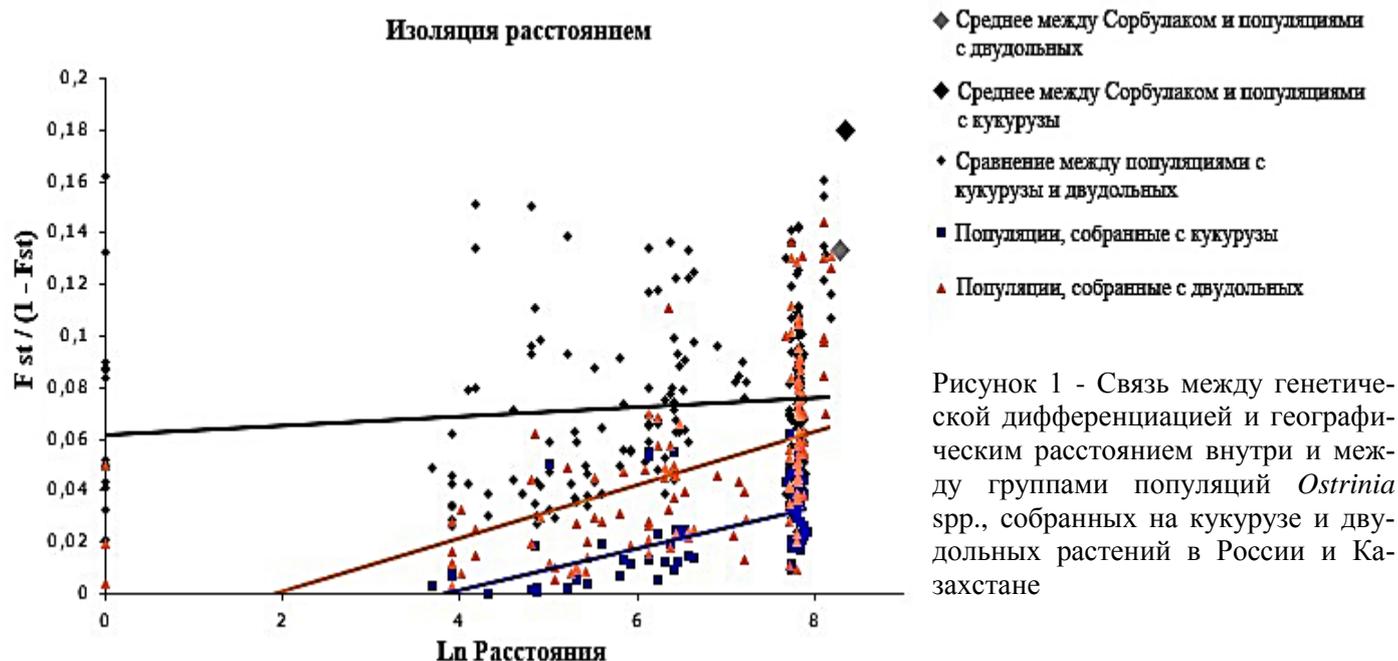


Рисунок 1 - Связь между генетической дифференциацией и географическим расстоянием внутри и между группами популяций *Ostrinia* spp., собранных на кукурузе и двудольных растений в России и Казахстане

Для любого выбранного географического расстояния порядка 3000 км, генетическое дифференцирование пар популяций, обитающих на одном и том же типе растения-хозяина, оказалось существенно ниже такового для пар популяций, обитающих на разных типах растений-хозяев.

Средний уровень генетической дивергенции между обитающим на кукурузе *O. nubilalis* и развивающимся на двудольных видах растений-хозяев *O. scapularis* относительно низок, но статистически достоверен и постоянен на протяжении всего обследованного географического диапазона (европейская часть России, Казахстан).

Был проведен Байесовский кластерный анализ распределения популяций *Ostrinia* spp, собранных с различных кормовых растений (кукуруза, полынь, коноп-

ля) в России (Краснодарский, Ставропольский края, Ростовская, Белгородская обл., респ. Татарстан) и Казахстане (окр. оз. Сорбулак) по набору микросателлитных локусов. Всего в анализ было включено 16 выборок, с числом ожидаемых кластеров $K =$ от 2 до 6. При числе ожидаемых кластеров $K = 2$ распределение распалось на два кластера, в строгой зависимости от вида кормового растения (кукуруза vs двудольные), и вплоть до $K = 6$, популяции, собранные на кукурузе, сохраняли единство вне зависимости от места сбора материала, причем этот кластер никогда не включал ни одну популяцию или индивидуум, собранный с двудольных видов растений-хозяев. При $K = 3$ общая дихотомия популяций с кукурузы и двудольных растений-хозяев сохранялась неизменной, но выявилась третья группа особей, собранных в Казахстане (окр. о. Сорбулак) и 7 особей, собранных в пос. Майский (Белгородская обл.) на полыни. При $K > 3$, выявленные группировки продолжали выделяться, однако новой сегрегации уже не обнаруживалось. Общая дихотомия образцов, собранных на кукурузе и двудольных растениях, сохранялась однотипной как для России, так и для Франции (Malausa et. al, 2007), несмотря на некоторые различия в использованном наборе микросателлитных локусов. Дисперсионный анализ подтвердил статистически достоверную дифференциацию изучаемых популяций ($P < 0,0001$). Полокусное сравнение обнаружило значительно более серьезный вклад одного из них (*OnT2*) на эффект растения-хозяина по сравнению с остальными (табл. 2).

Таблица - 2 Оценки эффектов локусов (значения F_{ST}) на дивергенцию популяций *Ostrinia* spp., собранных с кукурузы vs двудольных кормовых растений на территории бывшего СССР (60 сравнений)

Локус	Россия/Казахстан		
	Мин.	Макс.	Средн.
<i>Ga54</i>	-0.021	0.339	0.033
<i>OnT2</i>	0.098	0.408	0.228
<i>OnT3</i>	-0.017	0.135	0.020
<i>D145</i>	-0.017	0.291	0.038
<i>D243</i>	-0.013	0.110	0.020
<i>D63</i>	-0.012	0.082	0.020
<i>D65</i>	-0.010	0.090	0.018
<i>T81</i>	-0.012	0.127	0.024

Все популяции, собранные на двудольных видах кормовых растений в Казахстане и европейской части России, оказались генетически близки друг к другу без признаков статистически значимой дифференциации по фактору «полынь vs конопля».

Отмечен небольшой эффект изоляции расстоянием (ИР), однако при этом степень дивергенции популяций, собранных на двудольных, значительно ниже, чем дифференциация популяций с двудольных и собранных на кукурузе. Первая популяция включала самцов, обладающих малыми и средними типами конечностей в равной пропорции. Между группами, несущими голени разных типов, микросателлитный анализ не выявил различий ($F_{ST} = -0.0002$, $P = 0.468$); также не выявилось в популяции из Сорбулака дефицита гетерозигот по какому-либо из локусов. В этой связи обнаруженный для этой популяции эффект ИР, по-видимому, характеризует

внутривидовую изменчивость, связанную с адаптацией насекомых к местным условиям.

Таким образом, полученные материалы не подтвердили существования какой-либо генетической дифференциации между обитающими в Казахстане и европейской части России на двудольных кормовых растениях популяциями, различающимися по морфологии конечностей самцов (малыми, средними или крупными) (т.е. *O. scapularis* и *O. narynensis* Mutuura et Mongoe, 1970). Соответственно, представленный нами материал согласуется с ранее высказанной гипотезой о том, что все обитающие в западной части России популяции на двудольных растениях объединяются в рамках одного политипического вида *O. scapularis sensu* Frolov *et. al.* (2007) вне зависимости от особенностей морфологии конечностей самцов.

Микросателлитный локус *OnT2* из нашего набора не сцеплен с полом, поскольку самки *Ostrinia* spp. (гетерогаметный пол) часто оказываются гетерозиготными по данному локусу. Локусы, кодирующие структуру голени самцов, также распадаются на две группы. Один из этих генов сцеплен с полом (*i*), другой – аутосомный (*Mt*) (Фролов, 1984). Однако, оба они не связаны с ассортативным спариванием (Frolov *et. al.*, 2007). Тем не менее, по этим локусам может обнаруживаться неравновесие по сцепленности с локусами, связанными с адаптацией насекомых к кормовым растениям и/или обуславливающих репродуктивную изоляцию.

Общий анализ популяционной структуры насекомых рода *Ostrinia*, собранных с кукурузы и с двудольных кормовых растений в России и Казахстане, показал, что, несмотря на дифференциацию по морфологии (строение голени средних ног самцов), положенную в основу систематики стеблевых мотыльков, четких генотипических границ между насекомыми, обитающими на двудольных видах растений-хозяев, не обнаруживается.

3.2 Взаимоотношения популяций стеблевых мотыльков с кормовыми растениями в Краснодарском крае

Значение растений в эволюции фитофагов наглядно показано в разных систематических группах (Кузнецов, 1952; Фролов, 1992). Выбор насекомыми растений для питания определяется совокупностью особенностей, которые могут выступать как в качестве барьера, ограничивающего возможность использования растений для питания, так и фактора, привлекающего насекомых (Вилкова, 1974). Пищевая специализация стеблевых мотыльков представляет собой не только существенное направление в эволюции этих насекомых, но и служит таксономическим признаком, имеющим принципиальное значение.

3.2.1 Динамика численности *Ostrinia scapularis* в западной части Краснодарского края

В 2008-2011 гг. автором, с целью выявления взаимоотношений стеблевых мотыльков с кормовыми растениями, проводились учеты численности в окр. г. Темрюк на основных растениях-хозяевах: кукурузе, конопле, дурнишнике, полыни.

Результаты учетов гусениц второго поколения в 2008 году показали, что в западной части Краснодарского края (г. Темрюк) насекомые предпочтительно засе-

ляли двудольные растения. В 2009 году учет численности гусениц проводили для первого и второго поколений; оценили степень заселяемости растений. В первом поколении, процент заселенных растений полыни составил 35%, дурнишника - 67%. Во втором поколении на полыни доля заселенных растений была 24%, дурнишника - 100% при плотности 8.64 гусеницы на растение.

На протяжении 2008 – 2011 гг. численность насекомых во втором поколении на двудольных кормовых растениях (дурнишнике и полыни) неуклонно росла, в то время как на кукурузе вредитель практически отсутствовал. На рисунке 2 показана общая динамика плотности гусениц *Ostrinia scapularis* на 1 м² площади на разных видах растений-хозяев в г. Темрюк.

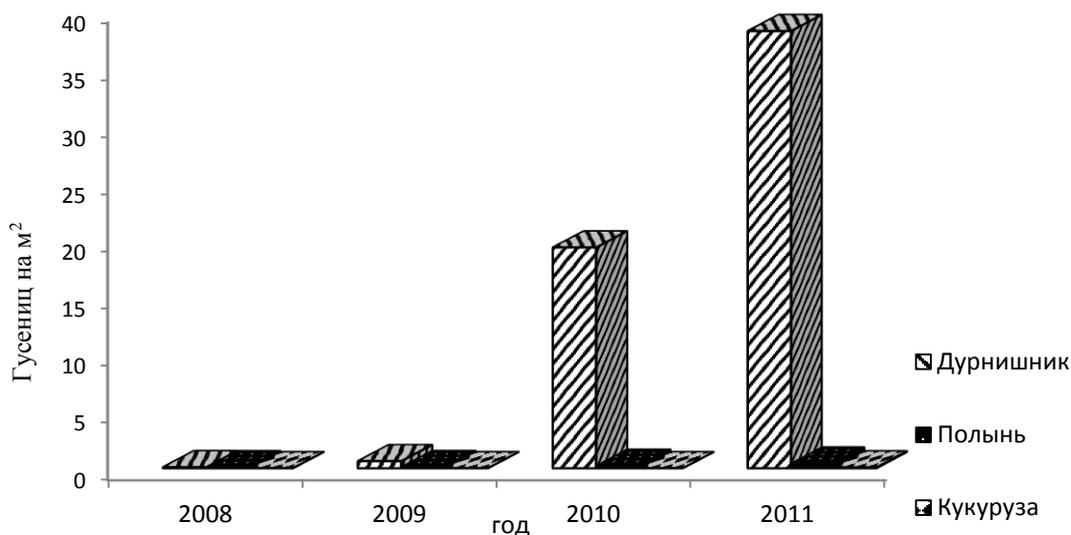


Рисунок 2 - Динамика численности *Ostrinia scapularis* на кормовых растениях в г. Темрюк за период 2008-2011 гг.

За указанный период особенно сильно выросла численность мотылька на дурнишнике зобовидном (*Xanthium strumarium* L.), достигшая во втором поколении 2011 г. 34.7 гусениц на растение, тогда как численность гусениц на полыни (*Artemisia vulgaris*) составила лишь 0.56 гусениц на растение.

3.2.2. Динамика численности *Ostrinia nubilalis* в восточной части Краснодарского края

Учеты численности *O. nubilalis* в восточной части Краснодарского края проводились посевах Кубанской опытной станции ВИР, НПО КОС–МАИС.

Результаты учета гусениц второго поколения в 2008 году показали, что в восточной части Краснодарского края (п. Ботаника) мотылек предпочтительно заселяет кукурузу, что кардинальным образом отличается от результатов аналогичных исследований проведенных в западной части края (г. Темрюк). Полученные результаты хорошо согласуются с представленными в главе 3, п. 3.1 результатами микросателитного анализа, свидетельствующими о существенных различиях изучаемых популяций стеблевых мотыльков, где в восточной части Краснодарского края доминирует предпочитающий кукурузу *Ostrinia nubilalis*, а в западной части края – численно преобладает заселяющий двудольные виды растений-хозяев *O. scapularis*.

Представленные результаты описывают взаимоотношения в двух-

компонентной системе «кормовое растение – фитофаг». Экспериментально доказано, что хозяин-фитофаг, питавшийся более благоприятным кормом, обеспечивает лучшие условия для развития паразитов, и наоборот (Шапиро, 1956). Многочисленные исследования на эту тему (Воронин, 1971; Шапиро, 1968) свидетельствуют о необходимости изучения трехчленной системы - триотрофа (кормовое растение - фитофаг - энтомофаг), как звена, где сосредоточены мощные потоки вещества, энергии и информации в агробиоценозах.

К настоящему времени подробно описан круг энтомофагов стеблевых мотыльков на разных видах кормовых растений и получены некоторые данные относительно их дифференциации (Фролов, 1982; Гостюхина, 1995).

По результатам учетов стеблевых мотыльков на кормовых растениях нами определено влияние энтомофагов на динамику численности и построены таблицы выживаемости (табл. 3).

Таблица - 3 Плотность яиц, гусениц и куколок кукурузного мотылька в п. Ботаника (среднее значение по первым поколениям за 2008-2009 гг.)

Стадия развития	Плотность живых на 1000 м ²	Снижение плотности; %	К
Всего яиц на кукурузе	30365.5	12.3	0.055
Гусеницы 1-2 возраста	26626.5	66.6	0.78
Гусеницы 3-5 возраста	8885.0	69.9	0.615
Куколки	2678.0	34.3	0.125
Имаго	1760.3	44.3	0.15
Яйцекладущие самки	981.1		
В целом за поколение		96.78	1.725
Индекс изменения плотности, I	в 2008 = 1,88		
	в 2009 = 9,46		

Важным, но не достаточно изученным, является вопрос о влиянии патогенных микроорганизмов на динамику численность стеблевых мотыльков, среди которых различают две группы: облигатные и факультативные. В рамках данной работы проводились работы с микроспоридиями и бакуловирусами, относящимися к облигатной группе, и грибами рода *Beauveria*, относящимися к факультативным патогенам.

3.2.3. Патогенные микроорганизмы и их влияние на динамику численности стеблевых мотыльков

Диагностика микроспоридий

Микроскопический анализ неокрашенных мазков внутренних органов показал наличие множества спор в ряде просмотренных препаратов. Форма и размеры спор, а также наличие характерной оболочки, позволили определить принадлежность этих спор *Nosema*-подобным формам микроспоридий.

В среднем встречаемость микроспоридий гусениц, собранных в 2005-2010 гг. в Краснодарском крае, составила $8.8 \pm 2.25\%$ (N=159). Зараженность гусениц в разных выборках изменяется от 3.0% до 17.2%, при этом максимальный показатель зараженности наблюдался в 2010 г. Статистически достоверных различий между насекомыми, собранными на разных кормовых растениях, в разных географических

точках и в разные годы не наблюдалось.

Морфометрические показатели спор микроспоридий позволяют идентифицировать данный вид паразита как *Nosema pyrausta* (Paillot) (Kramer, 1959).

Заражение микроспоридиями кукурузного мотылька на территории России выявлено впервые. Зараженность гусениц микроспоридиями не превышала 17.5%, однако случаи инфекции выявлены во всех проанализированных выборках 2005-2010 гг. вне зависимости от вида кормового растения и места обитания насекомых. Наличие запаса инфекции служит важной предпосылкой для возникновения эпизоотий, оказывающих существенное влияние на динамику численности массовых видов насекомых (Соколова, Исси, 2001).

Молекулярная диагностика бакуловирусных инфекций *Ostrinia nubilalis*.

Эпизоотии вирусной этиологии наблюдались в природной популяции кукурузного мотылька на посевах кукурузы в Краснодарском крае (п. Ботаника Гулькевичский р-н) в 1996 и 2004 гг., чему предшествовали периоды депрессии численности вредителя.

Образцы вирусных частиц, выделенные из погибших насекомых, использовали для экстракции геномной ДНК и амплификации консервативных участков генов полиэдрина *polh* и фактора поздней элонгации *lef8* (Токарев и др., 2009). При использовании образцов матричной ДНК с праймерами *polhF:polhR* (0,5 пМол на пробу) положительной реакции получить не удалось. С учётом того, что использованы вырожденные праймеры, концентрация эффективного праймера в этой смеси значительно ниже. Кроме того, образец неразведенной матричной ДНК мог содержать различные ингибиторы *Taq*-полимеразы, а также избыточное количество неспецифической ДНК, способной интерферировать с праймерами. В связи с этим положительную реакцию наблюдали при повышении концентрации праймеров (1 и более пМол на пробу) и при снижении концентрации вирусной ДНК (разведение в 10 и более раз) (рис. 3).

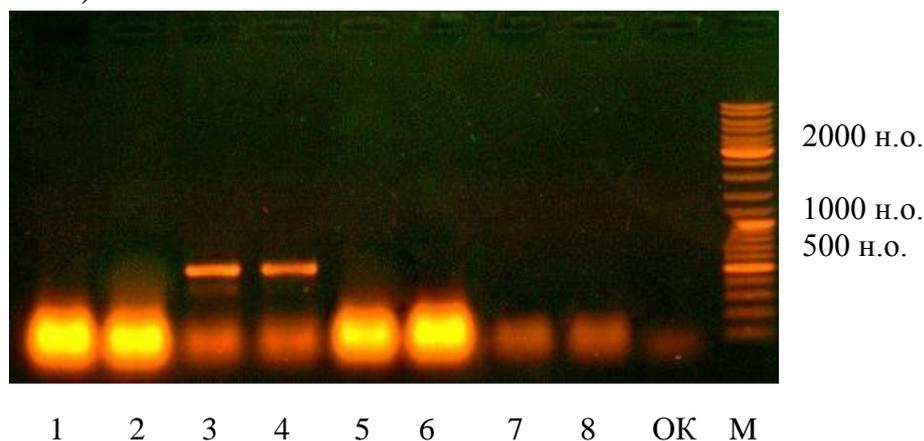


Рисунок 3 - Электрофореграмма продуктов амплификации образцов ДНК вируса ядерного полиэдроза стеблевых мотыльков с праймерами *polhF:polhR* в концентрации 5 пМол (1-4) и 0,5 пМол на пробу. В качестве матрицы использовали неразведенные (1, 2, 5, 6) и разведенные в десять раз (3, 4, 7, 8) образцы вирусной ДНК. ОК-отрицательный контроль (реакционная смесь содержит 5 пМол каждого праймера и не содержит матрицы ДНК); М – маркер молекулярного веса

Полученные продукты клонированы в *pAL-TA* векторе и секвенированы на автоматическом секвенаторе, по одной повторности на локус. Нуклеотидная последовательность, полученная с праймерами, специфичными к фрагменту гена *polh*,

показала максимальное сходство на уровне 83-84% с гомологичным локусом известных видов вирусов ядерного полиэдроза чешуекрылых. Напротив, вновь полученный сиквенс локуса *lef 8* показал сходство на уровне 77-78% с соответствующими сиквенсами вирусов гранулёза чешуекрылых, которые составляют филогенетическую группировку, обособленную от вирусов ядерного полиэдроза.

Наиболее логичное объяснение наблюдаемого расхождения результатов секвенирования двух разных локусов вирусной ДНК заключается в том, что погибшие гусеницы краснодарской популяции кукурузного мотылька, использованные для экстракции ДНК, были заражены по меньшей мере двумя разными вирусами – ядерного полиэдроза и гранулёза. Оба молекулярных гаплотипа свидетельствуют об уникальности бакуловирусов, выявленных в настоящей работе.

Молекулярная филогения штаммов рода Beauveria заражающих чешуекрылых из рода Ostrinia.

Распространенность грибов рода *Beauveria* в природных популяциях стеблевых мотыльков наблюдалась на уровне не более 2%. Всего за весь период исследований выделено пять штаммов энтомопатогенных грибов. С целью однозначной идентификации грибных штаммов, выделенных из стеблевых мотыльков, проведено сравнение морфо-культуральных признаков и нуклеотидных последовательностей гена *tef* (translation elongation factor). Большинство штаммов оказались однотипными по макроморфологии. Несмотря на ярко выраженные отличия по морфо-культуральным свойствам между группами штаммов, дифференцировать индивидуальные штаммы грибов из насекомых различного географического происхождения (Забайкальский, Краснодарский края), не представляется возможным без применения молекулярно-генетического анализа штаммов. Результаты анализа показали более высокий уровень дифференциации штаммов в сравнении с макроморфологией колоний, и в то же время несоответствие между морфологическими и генотипическими признаками.

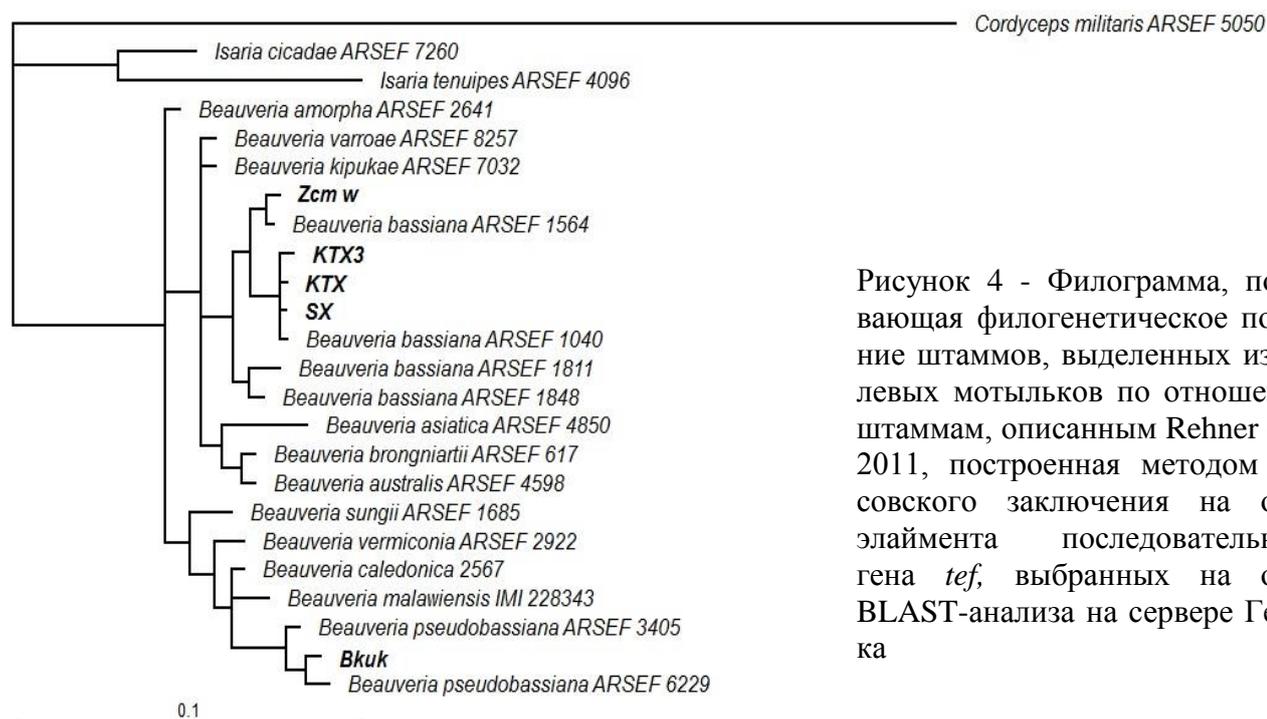


Рисунок 4 - Филограмма, показывающая филогенетическое положение штаммов, выделенных из стеблевых мотыльков по отношению к штаммам, описанным Rehner et al. в 2011, построенная методом Байесовского заключения на основе элаймента последовательностей гена *tef*, выбранных на основе BLAST-анализа на сервере Генбанка

В частности, штаммы SX, KTX, KTX3 обладают молекулярным гаплотипом ге-

на *tef*, идентичным таковому эталонного штамма ARSEF 1040 из тутового шелкопряда в Японии, являющегося типовым штаммом *Beauveria bassiana sensu Rehner et al.* 2011. Соответственно, на филогенетическом дереве они образуют единый кластер с данным штаммом (рис. 4). Штамм ZCm/w демонстрирует максимальное сходство со штаммом ARSEF 751 и тоже формирует отдельный кластер в рамках филогенетической линии, соответствующей *B. bassiana sensu Rehner et al.* 2011. Наконец, штамм Bkuk оказывается наиболее далек от других штаммов из чешуекрылых, изученных в настоящей работе, и идентифицируется как *B. pseudobassiana* (рис. 4). Несмотря на то, что дифференцировать все изученные штаммы по локусу *tef* не удается, полученные результаты показывают их принадлежность к разным подвидам *B. bassiana* и видам *Beauveria* и свидетельствуют о необходимости анализа более переменных локусов. К сожалению, проанализированная выборка недостаточна для каких-либо заключений о закономерностях распространения грибов, относящихся к определенным филогенетическим линиям, и их влияния на природные популяции *Ostrinia spp.*

В целом, полученные данные указывают на то, что из трех групп патогенов, изученных в настоящей работе, наибольшее значение для снижения численности стеблевого мотылька, по-видимому, имеют бакуловирусы.

3.3. Выживаемость стеблевых мотыльков на кукурузе при искусственном заселении растений

В исследованиях дифференциации насекомых по кормовым растениям существует ряд сложных и дискуссионных проблем. Одна из них – различие биологических рас и видов-двойников (Фролов, 1990, 1992). Интересным является и тот факт, что дифференциация популяций фитофага обнаруживается даже в пределах Краснодарского края (Серапионов, 2008). Дифференциальная способность к выживанию европейских популяций *O. nubilalis* и *O. scapularis* в связи с гостальной пищевой специализацией известна давно (Фролов, Хроменко, 1980; Фролов, 1984; Thomas *et al.*, 2004). Проведенные нами опыты с искусственным заселением кукурузы в 2009-2011 гг. эту закономерность полностью подтвердили.

3.3.1. Дифференциальная выживаемость насекомых разных популяций в опытах с искусственным заселением

Опыты по искусственному заселению в 2009 г. проводили в г. Темрюк в 7 вариантах при 3 рендомизированных повторениях. Участвовали популяции, собранные на кукурузе в п. Ботаника, на дурнишнике и полыни в г. Темрюк, и на конопле посевной в Казахстане (линия, гомозиготная по аллелю *i*), а также и их гибридные формы.

Максимальная выживаемость гусениц в опыте зафиксирована в варианте заселения растений популяцией из п. Ботаника с кукурузы. Высокой выживаемостью характеризовались также особи от скрещивания ♀ Ботаника-кукуруза и ♂ Казахстан-конопля (рис. 5).

В вариантах заселения кукурузы популяцией с конопли и гибридами от реципрокного скрещивания ♀ Казахстан-конопля x ♂ Ботаника-кукуруза, выживших

гусениц не найдено.

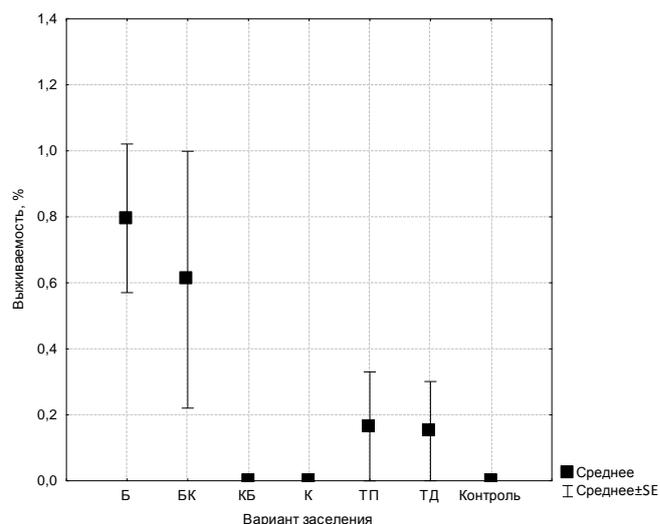


Рисунок 5 - Выживаемость (%) гусениц стеблевого мотылька при искусственном заселении кукурузы. Б - популяция с кукурузы из п. Ботаника; БК - гибрид F₂ от скрещивания ♀ Ботаника-кукуруза x ♂ Казахстан-конопля; КБ - гибрид F₂ от реципрокного скрещивания ♀ Казахстан-конопля x ♂ Ботаника-кукуруза; К - популяция из Казахстана с конопли посевной (линия, гомозиготная по аллелю i); ТП - популяция с полыни обыкновенной, г. Темрюк; ТД - популяция с дурнишника обыкновенного, г. Темрюк

Дифференциальная выживаемость на кукурузе гусениц реципрокных вариантов скрещивания краснодарской (с кукурузы) и казахской (с конопли) популяций связана с материнским эффектом родителя. Подобный эффект у «пищевых» форм стеблевых мотыльков ранее не обнаруживали.

В настоящее время исследования по сравнительной оценке выживаемости восточноазиатских популяций (*O. furnacalis*, *O. orientalis* и др.) на «своих» и «чужих» кормовых растениях, практически отсутствуют. В 2010 г. нами проведены опыты по искусственному заселению кукурузы как европейскими популяциями *O. nubilalis* и *O. scapularis*, так и азиатскими *O. furnacalis*. Опыты проводили в х. Слободка Славянского р-на и г. Темрюк в 6 вариантах при 3-5 рендомизированных повторениях.

В опыте участвовали популяции из Амурской обл. с кукурузы (*O. furnacalis*); Амурской обл. с конопли (*Ostrinia* spp.); Иркутской обл. с полыни обыкновенной (*O. scapularis*); Краснодарского края (п. Ботаника) с кукурузы (*O. nubilalis*); Краснодарского края (г. Темрюк) с дурнишника зобовидного (*O. scapularis*); Краснодарского края (г. Темрюк) с полыни обыкновенной (*O. scapularis*). Заселяемые насекомые относятся к роду *Ostrinia* с трехлопастным укусом самцов, представляющие собой комплекс трудноразличимых биологических рас и видов-двойников, различающихся по вторично-половым признакам голеней средних ног самцов (Mutuura, Munroe, 1970).

Полученные в результате учета и сбора гусениц данные свидетельствуют, что в настоящее время западная граница распространения восточного стеблевого мотылька *Ostrinia furnacalis* на кукурузе скорее всего проходит по Амурской области. В Восточной Сибири (Иркутская обл., респ. Бурятия, Забайкальский край) кукурузу не выращивают, а в Западной Сибири каких-либо следов ее заселения кукурузным мотыльком не обнаружено (Фролов, 1991). Таким образом, разрыв в распространении европейского стеблевого мотылька *O. nubilalis* (восточнее Волги на кукурузе не обнаружен) и восточного стеблевого мотылька (западнее Амурской обл. не отмечается) превышает 5,5 тыс. километров.

Максимальная выживаемость в опыте зафиксирована в вариантах заселения растений популяциями, собранными на кукурузе в Амурской области и Краснодар-

ском крае, и была значительно выше в сравнении с другими вариантами заселения кукурузы насекомыми, собранными с двудольных растений (конопля, дурнишник, полынь) (рис. 6).

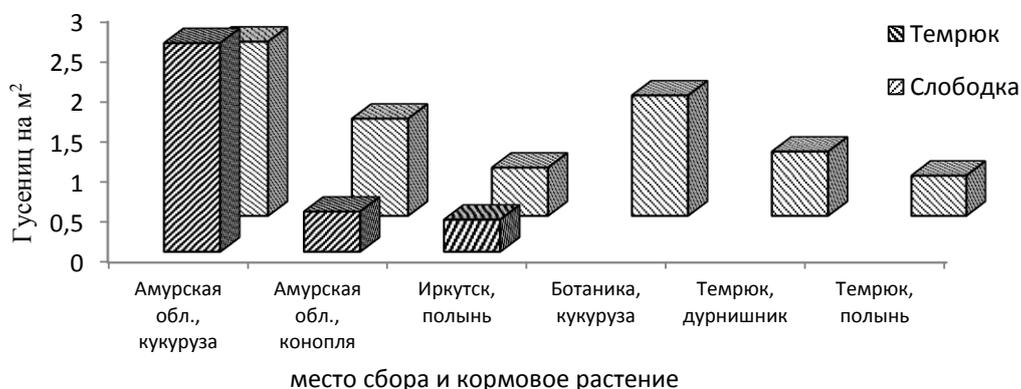


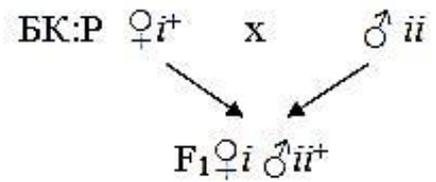
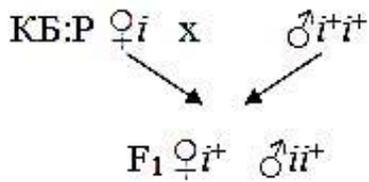
Рисунок 6 - Выживаемость гусениц стеблевых мотыльков (%) при искусственном заселении кукурузы в 2010 г.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что популяции, собранные с двудольных видов растений-хозяев, вне зависимости от региона обитания насекомых и их таксономической принадлежности, обнаруживали низкую выживаемость при питании на кукурузе, в то время как популяции европейского *O. nubilalis* и восточного стеблевого *O. furnacalis* мотыльков оказались примерно в равной степени адаптированными к питанию на кукурузе.

3.3.2 Эффект половой хромосомы в отношении способности стеблевого мотылька выживать на кукурузе

В опыте для диссертационной работы использованы две популяции стеблевых мотыльков: 1) потомство от собранных на конопле в Казахстане диапаузирующих гусениц; 2) потомство от гусениц, собранных в Краснодарском крае (п. Ботаника Гулькевичский р-н) на кукурузе.

Целью эксперимента являлась оценка влияния локализованного в половой хромосоме гена *invagination* (*i*) на способность гусениц выживать на кукурузе. Этот ген детерминирует формирование на голнях самцов стеблевых мотыльков глубокого вдавления (Фролов, 1984) и обнаруживается только у насекомых, предпочитающих двудольные виды растений-хозяев. Для заселения использовали гибридное потомство от скрещивания насекомых, собранных на конопле (Казахстан) и кукурузе (п. Ботаника Краснодарский край). Схема получения потомства следующая. После перезимовки в лаборатории, из казахской популяции для скрещивания отбирали самцов, несущих инвагинацию «средней» голени (т.е. генотипа *ii*). Потомство от их скрещивания с самками казахской популяции воспитывали на ИПС посемейно и для дальнейшего использования отбирали лишь те семьи, матери которых несли аллель *i* (т.е. все их мужское потомство несло инвагинацию на голнях). Особей из таких семей скрещивали с воспитанным на ИПС потомством насекомых, собранных на кукурузе (п. Ботаника Краснодарский край), согласно схемам:



Потомство от родительских пар в обоих вариантах скрещивания (первый обозначен КБ, а второй – БК, по 12 и 13 семей в каждом варианте, соответственно) воспитывали отдельно на ИПС. Параллельно на ИПС вели линии рекуррентного родителя из Казахстана, гомозиготные по аллелю i (обозначены ЧЛ).

Для разведения использовали стандартный состав среды (Фролов, 1993); насекомых содержали в камере при температуре 28° и фотопериоде 16 часов.

Не смотря на то, что выживаемость была низкой в варианте заселения ЧЛ x КБ, различия по выживаемости потомств реципрокных вариантов полностью согласуются с выше описанными результатами опыта по оценке выживаемости насекомых на кукурузе (табл. 4).

Таблица - 4 Собранный материал по опыту с искусственным заселением растений

Вариант	Всего заселено растений	Кол-во яиц	Всего дожило гусениц до 5 возраста (% от заселенного кол-ва)	В том числе			
				мертвые	паразиты	имаго ♀ ♂	диапаузирующие гусеницы
ЧЛ x КБ	42	3533	23 (0.65)	12	7	- 1 <i>ii</i>	4
ЧЛ x БК	46	4096	39 (0.95)	16	11	2 1 <i>i⁺i⁺</i>	9

В целом полученные результаты подтверждают наличие ярко выраженной пищевой специализации у представителей *Ostrinia* spp., собранных с разных растений-хозяев. Вне зависимости от региона обитания насекомых и их таксономической принадлежности, при питании на кукурузе наблюдалась низкая выживаемость *Ostrinia scapularis*, в то время как популяции мотыльков европейского *O. nubilalis* и восточного кукурузного *O. furnacalis* оказались в равной степени адаптированными к питанию на кукурузе.

ВЫВОДЫ

1. В результате изучения генетической структуры 16 популяций стеблевых мотыльков, собранных в 10 областях России и Казахстане, по 8 аутосомным микросателлитным локусам, убедительно доказана доминирующая роль кормового растения как фактора, определяющего популяционную структуру насекомых.

2. Уровень межвидовой дифференциации у *Ostrinia* spp. по микросателлитным маркерам мало зависит от расстояния между районами обитания популяций (в пределах европейской части России и Казахстана).

3. Внутривидовая генетическая дивергенция у *O. nubilalis* по использованным маркерам не обнаружена, тогда как географические популяции *O. scapularis* распадаются на кластеры соответственно особенностям строения средних голеней самцов.

4. Существенные различия в популяционной структуре фитофага на западе и во-

стоке Краснодарского края подтверждаются результатами микросателлитного анализа. В восточной части края, характеризующейся широкой распространенностью товарных посевов кукурузы на зерно, численно преобладает *O. nubilalis*, а в западной части доминирует заселяющий двудольные виды растений-хозяев *O. scapularis*, что очевидно связано с отсутствием здесь, до недавнего времени, выращивания кукурузы в промышленных масштабах.

5. Данные зараженности стеблевых мотыльков патогенными микроорганизмами сопоставлены с динамикой численности их хозяев. Из изученных трех групп патогенов - микроспоридий, бакуловирусов и грибов из рода *Beauveria* - способность вызывать эпизоотии обнаружена у бакуловирусов.

6. Опыты с искусственным заселением кукурузы подтверждают высокий уровень выживаемости приспособленных к обитанию на этом кормовом растении насекомых по сравнению с особями из популяций, обитающих на двудольных растениях-хозяевах. Различия по способности выживать на кукурузе хорошо наследуются при явном преобладании материнского эффекта.

Практические рекомендации

1. Для целей диагностики видовой принадлежности насекомых-хозяев, их филогенетических связей, а также зараженности энтомопатогенами рекомендуется шире использовать молекулярно-биологические методы, в т.ч. микросателлитные маркеры.

2. Сведения о популяционной структуре и особенностях взаимоотношений стеблевых мотыльков с кормовыми растениями необходимо учитывать при прогнозировании численности, а также при организации мероприятий, направленных на защиту растений от этих вредителей.

3. Методические подходы, использованные при изучении меж- и внутривидовой изменчивости стеблевых мотыльков, рекомендуется использовать при изучении популяционной структуры у насекомых-фитофагов в агроценозах.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ

1. Малыш Ю.М. Зараженность микроспоридиями стеблевых мотыльков рода *Ostrinia* (Lepidoptera: Crambidae) в Краснодарском крае / Малыш Ю.М., Токарев Ю.С., Ситникова Н.В., **Конончук А.Г.**, Грушецкая Т.А., Фролов А.Н. // Паразитология. - 2011. - Т. 45, - № 3. - С. 234-244.

2. Frolov A. From Russia with love: genetic differentiation in trilobed uncus *Ostrinia* spp. follows food plant, not hairy legs / Frolov A., Audiot P., Bourguet D., **Kononchuk A.G.**, Malysh J.M., Ponsard S., Streiff R., Tokarev Y.S. // Heredity. - 2012. - V.108 - N 2. - P. 147-156

3. Серапионов Д.А. Популяционная структура кукурузного мотылька в Краснодарском крае / Серапионов Д.А., **Дубровина (Конончук) А.Г.**, Фролов А.Н. // Биологическая защита растений – основа стабилизации агроэкосистем. Выпуск 5. Материалы докладов международной научно-практической конференции (Биологическая защита растений, перспективы и роль в фитосанитарном оздоровлении агроценозов и получении экологически безопасной сельскохозяйственной продукции) 23 сентября – 25 сентября 2008 г. Краснодар: ВНИИБЗР РАСХН. - 2008. - С. 158-160.

4. Иващенко В.Г. Устойчивость кукурузы к вредным организмам как важнейший резерв реализации высокого потенциала продуктивности селекции на гетерозис / Иващенко В.Г., Фролов А.Н., **Дубровина (Конончук) А.Г.**, Гаркушка В.Г. // Зерно и хлеб России. IV Международный конгресс 11-13 ноября 2008г. С-Петербург: - 2008. - С. 46-48.

5. **Конончук А.Г.** Пищевая специфичность популяций кукурузного мотылька (*Ostrinia nubilalis* Hbn.) в Краснодарском крае / Конончук А.Г. // Тр. Ставропольск. отд. Русского энтомол. об-ва, Вып. 5. Мат. 2 Межд. научно-практич. интернет-конф. «Актуальные вопросы энтомологии» (Ставрополь, 1 марта 2009 г.). Ставрополь: Аргус, 2009. - С. 226-228.

6. Токарев Ю.С. Метод диагностики вируса ядерного полиэдроза кукурузного мотылька *Ostrinia nubilalis* Hbn. на основе ПЦР / Токарев Ю.С., **Дубровина А.Г.**, Малыш Ю.М., Митрофанов В.Б., Фролов А.Н. // В кн.: Высокопроизводительные и высокоточные технологии и методы фитосанитарного мониторинга. Приложение к журналу «Вестник защиты растений». СПб.: ВИЗР, 2009. - С. 24-27.

7. **Конончук А.Г.** Молекулярная диагностика бакуловиральных инфекций стеблевого кукурузного мотылька *Ostrinia nubilalis* Hbn. (Lepidoptera, Pyralidae) / **Конончук А.Г.**, Малыш Ю.М., Токарев Ю.С., Митрофанов В.Б., Фролов А.Н. // Материалы международной молодежной конференции «Инфекционная патология членистоногих» Санкт-Петербург, Пушкин, 26-29 марта 2012г. – СПб., 2012. - С. 28-29.