

УДК 595.773.4(476)

Методический подход к исследованию генофондов короткоусых двукрылых *Drosophila* группы *virilis* в природных популяциях Беларуси

А.А. Сурков, Г.Г. Гончаренко, В.Г. Митрофанов, Л.И. Корочкин

Введение

Известно, что виды состоят из системы в той или иной мере связанных между собой популяций, каждая из которых обладает **собственным генофондом**, передающимся потомкам по определенным генетическим законам. Точная информация о **состоянии популяционно-генетических ресурсов** видов животных и растений является основополагающей для **решения эколого-популяционных проблем адаптации** видов к условиям изменяющейся природной и техногенной среды, а также разработки научных принципов современной **стратегии управления и сохранения популяционных генофондов**.

В связи с этим вопросы, посвященные современному методическому подходу, а также методам молекулярно-генетического анализа популяционных генофондов короткоусых двукрылых *Drosophila* группы *virilis* в природных популяциях Беларуси, представляют существенный интерес.

Методический подход к исследованию популяционных генофондов

Усилиями нескольких поколений ученых в настоящее время популяционная генетика стала хорошо развитой областью биологических наук, которая позволяет не только изучать микроэволюционные процессы, но и дает возможность разработать принципы управления генетическими ресурсами популяций **индикаторных и хозяйственно-ценных видов**. Уже к концу 70-х годов исследователи начали применять четкий набор популяционно-генетических параметров, позволяющих адекватно описать генетическую структуру популяций, а также оценить уровень генетического разнообразия и тем самым дать точную оценку состояния генетических ресурсов различных популяций (Левонтин, 1978; Айала, 1984). В основу этих исследований был положен **метод электрофоретического анализа изоферментов**, возникший на базе достижений биохимической и молекулярной генетики (Lewontin, Hubby, 1966; Harris, 1966; Johnson et al., 1966; Prakash et al., 1969; Richmond, 1972; Ayala, Powell, 1972; Ayala et al., 1972; Prakash 1977; Левонтин, 1978; Айала, 1984). Достоинство этого метода состоит в том, что по числу и расположению гистохимически окрашенных фракций на специальных гелевых пластинах можно непосредственно судить о генах, кодирующих тот или иной фермент, и безошибочно устанавливать генотипы анализируемых особей.

На рис. 1 представлена схема типичной электрофореграммы (гелевая пластина), полученная в результате электрофоретического фракционирования и гистохимического выявления фермента фосфоглюкомутазы (PGM) из диплоидных тканей девяти различных особей околотовных двукрылых из рода *Drosophila* (*D. littoralis*). На гелевой пластине хорошо видно, что особи *D. littoralis* № 4 и № 7 обладают **гетерозиготным генотипом** (т.е. имеют два различных аллельных варианта — $PGM^{1.00}$ и $PGM^{0.80}$), тогда как остальные семь мух обладают **гомозиготными генотипами** различного класса (т.е. каждая из них имеет по два идентичных аллеля, в случае особей № 1, 3, 6 это $PGM^{0.80}$, а особей № 2, 5, 8, 9 — $PGM^{1.00}$).

Сходным способом определяются генотипы и по генам, кодирующим другие ферменты особей различных видов околотовных двукрылых *Drosophila* группы *virilis*. Взрослые особи белорусских представителей *Drosophila* группы *virilis* исследовались методом электрофореза

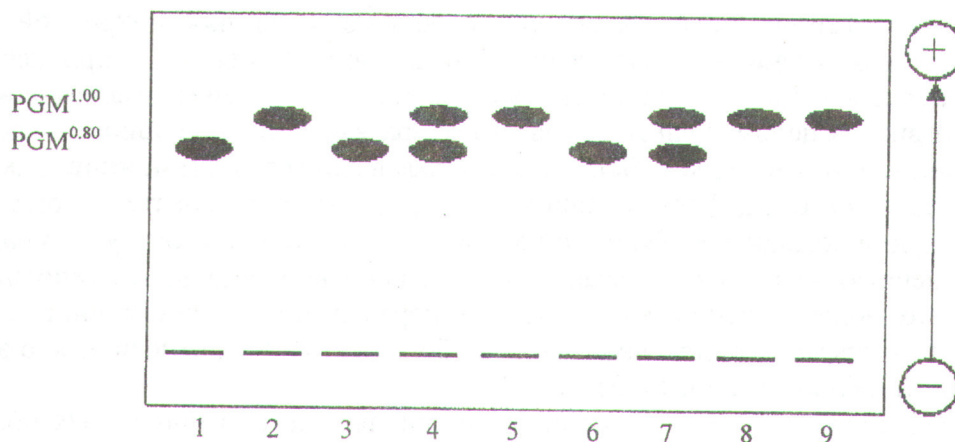


Рис. 1. Схематическое изображение электрофореграммы фосфоглюкомутазы из образцов диплоидной ткани девяти различных особей *D. littoralis*.

Каждая особь гомогенизировалась в 25 мкл дистиллированной воды или гелевого буфера. Электрофоретическое фракционирование гомогенизированных экстрактов индивидуальных особей проводилось нами по 10 ферментам в 13-14% крахмальном геле с использованием двух буферных систем: А) трис-ЭДТА-боратная, pH 8.6; В) трис-цитрат, pH 6.2. Все параметры электрофоретического фракционирования, а также экстракция и гистохимическое выявление ферментов подробно приведены нами ранее (Гончаренко и др. 1984, Гончаренко 1987). Обозначение выявленных электрофоретических вариантов дано по общепринятой номенклатуре Пракаша с соавторами (Prakash et al., 1969), в соответствии с которой наиболее часто встречающийся электроморф по каждому локусу у *D. virilis* и кодирующий его аллель обозначались символом 1.00, а все другие аллельные варианты, встреченные у проанализированных нами видов *Drosophila* группы *virilis* обозначены цифровыми символами в зависимости от их электрофоретической подвижности относительно 1.00. Нулевые аллели обозначены символом 0. Наглядное изображение электрофоретических спектров эстераз *D. virilis* и *D. littoralis* с выявленными электрофоретическими вариантами приведено на рис. 2.

Таким образом, типирование генотипов той или иной особи индикаторных видов *Drosophila* группы *virilis* с помощью метода изоферментов по большому набору генов становится доступной процедурой для любого исследователя.

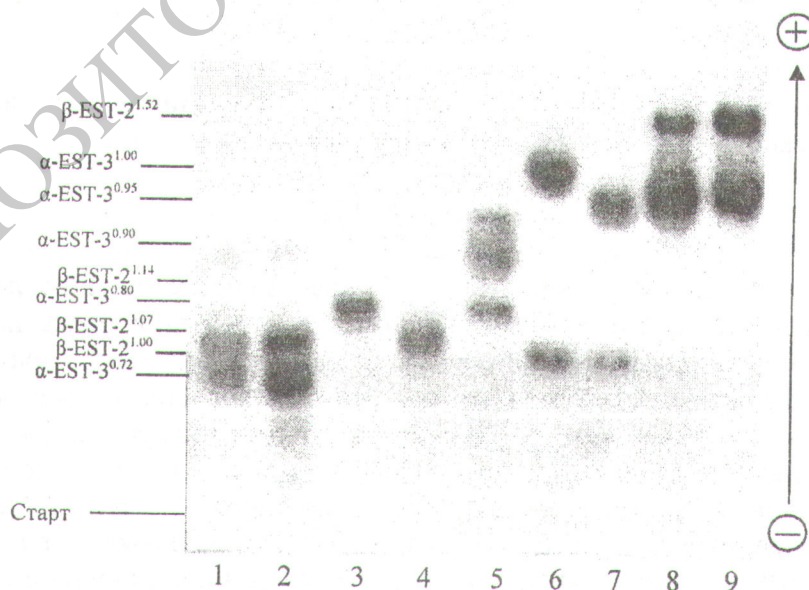


Рис. 4. Электрофореграмма эстераз *Drosophila* рода *virilis*: *D. texana* – 1, 2; *D. americana* – 3; *D. novomexicana* – 4; *D. virilis* – 5, 6, 7; *D. littoralis* – 8, 9); 1, 2 – α-EST-3^{0.72}; 3, 4 – α-EST-3^{0.80}; 5 – α-EST-3^{0.90}; 7, 8, 9 – α-EST-3^{0.95}; 6 – α-EST-3^{1.00}; 1, 2, 6, 7 – β-EST-2^{1.00}; 4 – β-EST-2^{1.07}; 3, 5 – β-EST-2^{1.14}; 8, 9 – β-EST-2^{1.51}; 14 – EST^{1.00}.

Анализ достаточно большой выборки особей из какой-либо природной популяции позволяет определить **генетическую структуру** данной популяции, а при исследовании нескольких таких выборок из различных частей ареала — оценить генетическую структуру изучаемого вида в целом. Генетическая структура является эволюционно сложившейся характеристикой, которая может быть описана как в **частотах генотипов**, так и в **частотах встречаемости аллелей**, формирующих эти генотипы. Исследователи обычно используют более удобную и компактную форму описания популяционной структуры в виде **аллельных частот**. В первую очередь это связано с тем, что соотношение частот генотипов в конкретных выборках может сильно отклоняться от генеральных значений по чисто стохастическим причинам, в то время как аллельные частоты более устойчивы относительно эффективности выборочности (Животовский, 1983).

За последние десятилетия в процессе развития генетики природных популяций сформировался четкий математический аппарат, который на основе электрофоретических данных позволил количественно оценивать основные популяционно-генетические параметры.

Одним из параметров, определяющих уровень генетической изменчивости в популяциях, является **доля полиморфных локусов**, или **полиморфность (P)**, которая рассчитывается как отношение числа полиморфных локусов (имеющих два и более различных аллеля) к общему количеству проанализированных локусов. Данный показатель обычно вычисляется по двум критериям полиморфности. В одном случае локус считается полиморфным, когда частота наиболее общего аллеля этого локуса не превышает 95% (P_{95}), а в другом — когда его частота не превышает 99% (P_{99}). Необходимо отметить, что этот показатель зависит от выборки проанализированных особей и вследствие этого не всегда точно отражает уровень генетической изменчивости в исследованных популяциях.

Более совершенной мерой, оценивающей уровень генетической изменчивости в популяциях, является показатель **гетерозиготности**, который практически не зависит ни от выборки насекомых, ни от процентного критерия, что имеет место в случае показателя полиморфности. В популяционных исследованиях используют параметр **наблюдаемой гетерозиготности (H_o)**, рассчитываемый для каждого локуса отдельно как отношение числа гетерозигот к общему количеству проанализированных особей, и параметр **ожидаемой гетерозиготности (H_e)**, который вычисляется для каждого локуса на основании его аллельных частот посредством следующего соотношения:

$$H_e = 1 - \sum x_i^2,$$

где x_i — частота i -того аллеля.

Средние значения наблюдаемой и ожидаемой гетерозиготности вычисляются как среднеарифметическое показателей H по всем локусам:

$$\bar{H} = \frac{1}{L} \sum H_j,$$

где H_j — гетерозиготность j -того локуса, а L — количество исследованных локусов.

При генетическом анализе популяций широко используется также показатель, называемый **средним числом аллелей на локус (A)**. Для вычисления этого параметра число всех найденных в исследовании аллелей делится на количество локусов. Так как A сильно зависит от выборки насекомых, генетики-популяционисты часто пользуются еще и показателем **среднего числа нередких аллелей на локус ($A_{1\%}$)**. При этом делить на количество локусов следует только число аллелей, которые встречаются в популяции с частотой более 1% (т.е. не редких аллелей). Параметры среднего числа аллелей на локус позволяют дать усредненную оценку аллельного разнообразия, характерного для той или иной популяции, а также для вида в целом.

Все вышерассмотренные параметры, включая аллельные частоты, позволяют описать генотипическую структуру, выявить уровень генетической изменчивости и тем самым дают

возможность оценить состояние **генофонда** исследуемых видов и популяций.

Таким образом, на основании электрофоретического анализа изоферментов, используя приведенные выше параметры, в настоящее время исследователи получили возможность точно **определять генетическую структуру и величину генетической изменчивости**, а также степень подразделенности, интенсивность межпопуляционного генного потока, уровень дифференциации и время дивергенции. При этом, как отмечается в фундаментальных работах Левонтина (1978), Nevo et al. (1984) и Айалы (1984) наиболее точные оценки в генетико-популяционных и эволюционных исследованиях можно получить лишь при соблюдении следующих условий.

1. Необходимо, чтобы выборка в каждой популяции обеспечивала материал **около 50 геномов дикого типа** на locus (в случае диплоидных насекомых это составляет около 25 особей).

2. Анализировать материал необходимо **только из природных популяций**.

3. Количество используемых для анализа **локусов** должно быть **не менее 14–20**.

4. Необходимо, чтобы **выборка локусов** была **максимально разнообразной** и исключала слишком высокий удельный вес всего одной или двух ферментных систем.

5. В анализ не должны включаться локусы с заранее известной изменчивостью (принцип **несмещенной выборки локусов**).

Работа выполнялась частично в рамках программ ГПФИ “Экология и адаптация”, Национальной АН Беларуси, программ по преодолению последствий катастрофы на ЧАЭС и поддержана различными научными грантами, такими как ISF “RW 2000”, “RW 2300”.

Abstract

The article describes the methodical approach for the investigation of population and genetic resources of the sibling-species of the *Drosophila* group *virilis* of the Palaearctic. The techniques to estimation of the genetic structure, gene diversity and gene variability in different natural populations of the *Drosophila* group *virilis* are given. The method of isozyme analysis that is the basis for the present-day population and genetic investigations are described.

Литература

1. Айала Ф. Введение в популяционную и эволюционную генетику: Пер. с англ. М.: Мир, 1984. – 230 с.
2. Гончаренко Г.Г. Аллозимная диагностика видов-двойников *Drosophila* группы *virilis* // ДАН СССР. – 1987. – Т. 295. N 4. – С. 976–980.
3. Гончаренко Г.Г., Митрофанов В.Г., Катохин А.Н. . Изучение биохимического полиморфизма у *Drosophila imeretensis* в природных популяциях Краснодарского края // Генетика. – 1984. – Т. XX. № 4. – С. 620–627.
4. Животовский Л. А. Статистические методы анализа частот генов в природных популяциях // Итоги науки и техники. Серия общая генетика. Т. 8. Теоретическая популяционная генетика. М.: ВИНТИ, 1983. – С. 76–104.
5. Левонтин Р. Генетические основы эволюции: Пер. с англ. М.: Мир, 1978. – 352 с.
6. Ayala F. J., Powell J. R. Allozymes as diagnostic characters of sibling species of *Drosophila* // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1972. – V. 69. – P. 1094–1096.
7. Ayala F. J., Powell J. R., Tracey M. L., Mourao C. A., Perez-Salas S. Enzyme variability in the *Drosophila willistoni* group. IV. Genic variation in natural populations of *Drosophila willistoni* // Genetics. 1972. – V. 70. – P. 113–139.
8. Harris H. Enzyme polymorphism in man // Proc. Roy. Soc. 1966. – V. 164. – P. 298–310
9. Johnson F. M., Kanapi C. G., Richardson R. H., Wheeler M. R., Stone W. S. An analysis of polymorphisms among isozyme loci in dark and light *Drosophila ananassae* strains from American and Western Samoa // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1966. – V. – 56. P. 119–125.
10. Lewontin R. C., Hubby J. L. A molecular approach to the study of genic heterozygosity

in natural populations. II. Amount of variation and degree of heterozygosity in natural populations of *Drosophila pseudoobscura*// Genetics. 1966. – V. 54. – P. 595–609.

11. Nevo E., Beiles A., Ben-Shlomo P. The evolutionary significance of genetic diversity: ecological, demographic and life history correlates// Lect. notes Biomath. – 1984. – V. 53. – P. 13–213.

12. Prakash S., Lewontin R. C., Hubby J. L. A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations. IV. Patterns of genic variation in central, marginal and isolated populations of *Drosophila pseudoobscura*// Genetics. 1969. V. 61. – P. 841–858.

13. Prakash S. Genetic divergence in closely related sibling species *Drosophila pseudoobscura*, *Drosophila persimilis* and *Drosophila miranda*// Evolution. 1977. – V. 31. – P. 14–23.

14. Richmond R. C. Enzyme variability in the *Drosophila willistoni* group. III. Amounts of variability in the superspecies *D. paulistorum*// Genetics. 1972. – V. 70. – P. 87–112.

Гомельский государственный
университет им. Ф. Скорины

Поступило 10.03.03

Институт биологии развития
им. Н.К.Кольцова, Москва

Институт биологии гена, Москва