

УДК 575.174.015.3

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ БЕЛКОВОГО ПОЛИМОРФИЗМА ЗЕЛеной ДУБОВОЙ (*TORTRIX VIRIDANA*) И ПАЛЕВОЙ (*ALEIMMA LOEFLINGIANA*) ЛИСТОВЕРТОК

Симчук А. П., Ивашов А. В.

Таврический национальный университет им. В. И. Вернадского, Симферополь, ecology@crimea.edu

Методом диск-электрофореза были исследованы одиннадцать ферментных систем личинок и имаго двух экологически и эволюционно близких видов – зеленой дубовой листовертки (*Tortrix viridana* L.) и палевой листовертки (*Aleimma loeflingiana* Hub.). Согласно полученным данным, палевая листовертка является более специализированным в плане выбора пищевого растения видом по сравнению с зеленой дубовой листоверткой. Об этом свидетельствует тот факт, что у палевой листовертки меньше количество изоимов тех ферментов, которые метаболизируют экзогенные субстраты и, соответственно меньше локусов их детерминирующих, по сравнению с зеленой дубовой листоверткой, а доля полиморфных из них ниже по сравнению с ферментами, не связанными с пищеварением.

Ключевые слова: генетическая изменчивость, изоферменты, *Tortrix viridana*, *Aleimma loeflingiana*.

ВВЕДЕНИЕ

Исследование белкового полиморфизма является одним из методов изучения биологических, в том числе и генетических параметров природных популяций [1, 2]. С его помощью возможно сравнительное изучение биохимического полиморфизма, а следовательно, в определенной степени, и полиаллелизма генетических локусов эволюционно и систематически близких организмов [3]. Это, в какой-то мере, приближает нас к пониманию закономерностей процессов адаптации на уровне популяций, микроэволюции и образования видов [4].

Известно, что зеленая дубовая листовертка (*Tortrix viridana* L.) и палевая листовертка (*Aleimma loeflingiana* Hub.) имеют сходную биологию и экологию [5]. В Крыму оба вида можно встретить в одних и тех же местах обитания, а периоды их развития практически совпадают. По нашим наблюдениям, в период личиночной фазы палевая листовертка в среднем на один возраст «отстает» от зеленой дубовой листовертки [5]. В связи с этим, одновременное исследование генетического полиморфизма популяций данных видов может представлять определенный интерес и в плане изучения их взаимоотношений.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Сбор личинок и имаго листоверток проводился на пробной площади, расположенной на Южном берегу Крыма близ села Лавровое (1,5 км от г. Ялта). До использования материал хранился в жидком азоте. Подготовка экстрактов проводилась, как было описано нами ранее [6]. Электрофорез проводили в приборе с вертикальным расположением гелевого блока. Используемые буферные системы приводятся ниже. Первые две из них являются стандартными, а третья была подобрана экспериментально.

Система № 1. Электродный буфер – 0,005М трис, 0,038М глицин, pH 8,35;
буфер концентрирующего геля – 0,051М трис, HCl, pH 6,9;
буфер разделяющего геля – 0,38М трис, HCl, pH 8,9; 5 [7].

Система № 2. Электродный буфер – 0,0083М трис, 0,03М диэтилбарбитуровая кислота, pH 7,0;
буфер концентрирующего геля – 0,051М трис, HCl, pH 5,5;
буфер разделяющего геля – 0,071М трис, HCl, pH 7,5 [7].

Система № 3. Электродный буфер – 0,005М трис, 0,038М глицин, pH 8,9;
буфер концентрирующего геля – 0,051М трис, HCl, pH 7,8;
буфер разделяющего геля – 0,38М трис, HCl, pH 9,9.

С целью проверки мономорфных локусов, а также уточнения структуры полиморфных систем проводили изоэлектрофокусирование в пластинах полиакриламидного геля (Т 5%, С 4%) с концентрацией амфолитов 2%, диапазоном pH 4,0–9,0 и добавкой глицина до конечной концентрации 0,5М [8]. После окончания изоэлектрофокусирования гель помещали в соответствующие инкубационные смеси, которые приведены в таблице 1.

Таблица 1

Условия фракционирования и окраски изучаемых ферментных систем

Фермент	Буфер		Концентрация геля (%)	Методика окрашивания (литературный источник)
	гелевый	электродный		
Эстераза	1	1	7,5	[2]
Щелочная фосфатаза	2	2	10	[2]
Протеаза	3	3	7,5	Инкубация с казеин (1%)-агаровым (2%) гелем с последующим окрашиванием амидочерным 10 В
Лейцинаминопептидаза	3	3	5,5	[2]
Гексокиназа	1	1	7,5	[2]
Альдегид-дегидрогеназа	1	1	7,5	0,1М трис-HCl, pH 7,4; НАД (0,25 мг/мл); ФМС (0,1 мг/мл); НСТ (0,25 мг/мл); бензальдегид (0,001 мг/мл)
Малик-энзим	3	3	8,5	[2]
Малатдегидрогеназа	3	1	7,5	[2]
Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа	1	1	8,5	[2]
Лактатдегидрогеназа	1	1	8,5	[2]
НАД-Н-дегидрогеназа	1	1	6,5	0,1М трис-HCl, pH 7,4; НАД (восстановл.) (0,3 мг/мл); НСТ (0,3 мг/мл)

Примечание к таблице: ФМС – феназинметасульфат; НСТ – нитросиний тетразолий; НАД – никотинамиддинуклеотид.

Типирование эстераз проводили с помощью ингибиторного анализа. при этом гели выдерживали в забуференных (трис-НС1 буфер, рН 7,4) растворах соответствующих ингибиторов в концентрации 10^{-4} М. Были использованы следующие ингибиторы: эзерин – ингибитор ацетилхолин- и холинэстераз; параоксон – ингибитор карбоксил-, ацетилхолин- и холинэстераз; п-хлормеркурибензоат – ингибитор арилэстераз. После двадцатиминутной инкубации (что оказалось вполне достаточным при толщине геля 0,7–1,0 мм) раствор ингибитора сливали, а гелевый блок окрашивали на эстеразу.

Электрофорез в градиенте концентрации полиакриламидного геля (7,5%–22,5%) проводили без использования буферной системы разделяющего геля [9].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Методом диск-электрофореза были исследованы одиннадцать ферментных систем личинок и имаго зеленой дубовой и палевой листовертки, и определены особенности, характерные для изоферментных спектров этих фаз развития каждого вида. Сразу же следует отметить, что из-за технических неудач с выявлением активности ЛДГ у личинок, данный фермент был исключен из последующего анализа.

Из таблицы 2 видно, что для имаго обоих видов характерен несколько больший процент полиморфных локусов, чем для личинок. По-видимому, этот факт связан с тем, что, с одной стороны, жизненное пространство имаго имеет более сложную структуру, а с другой – при переходе от личинки к имаго расширяется структура функциональных нагрузок на организм (расселение, яйцепродукция, спаривание, откладка яиц).

В процессе метаморфоза качественные и количественные изменения в той или иной степени затрагивают все изучаемые изоферментные системы. Но, если у зеленой дубовой листовертки количество локусов, контролируемых исследуемые ферментные системы, до и после метаморфоза оставалось практически неизменным, то у палевой листовертки наблюдалась иная картина (табл. 2). Ряд авторов связывают величину генетического разнообразия со степенью специализации видов к окружающим условиям [2, 10]. Следовательно, меньший уровень полиморфизма в популяции палевой листовертки можно связывать с большей степенью специализации данного вида.

Известно, что для различных функциональных групп ферментов характерно различное соотношение между уровнями аллозимной и изозимной изменчивостью [10]. В связи с этим, все изучаемые ферментные системы были разделены на несколько групп согласно с их функциональной нагрузкой. Была выделена группа ферментов, метаболизирующих экзогенные субстраты (ФЭС), которая, в свою очередь, была подразделена на ферменты с широкой субстратной специфичностью (ФШС) и ферменты с более узкой субстратной специфичностью (ФУС). К ферментам с широкой субстратной специфичностью были отнесены эстеразы и протеазы, а к группе ФУС – лейцинаминопептидаза и щелочная фосфатаза.

Оказалось, что у палевой листовертки в целом, а у личинок особенно, наблюдается более низкий, чем у зеленой дубовой листовертки уровень изозимной

Таблица 2

Сравнительный анализ изозимной и аллозимной изменчивости различных групп ферментов зеленой дубовой и палевой листоверток

Вид	Фаза развития	Единица измерения	Локусы				
			В целом	ФЭС			Прочие
				Все	ФШС	ФУС	
Локусы							
ЗДЛ	личинка	Зон/ФК	2,8	4,3	6,0	2,5	1,4
	имаго	Зон/ФК	2,8	3,8	5,0	2,5	2,0
ПЛ	личинка	Зон/ФК	1,9	2,8	3,5	2,0	1,2
	имаго	Зон/ФК	2,4	3,0	3,5	2,5	2,0
Полиморфные локусы							
ЗДЛ	личинка	Зон/ФК	1,3	2,3	3,5	1,0	0,6
		%	48	53	58	40	43
	имаго	Зон/ФК	1,7	2,5	4,0	1,0	1,0
		%	60	67	80	40	50
ПЛ	личинка	Зон/ФК	1,0	1,3	2,0	0,5	0,8
		%	53	45	57	25	67
	имаго	Зон/ФК	1,4	1,5	2,5	0,5	1,4
		%	59	50	71	20	70
Неизменные в онтогенезе локусы							
ЗДЛ	личинка	Зон/ФК	1,4	2,3	3,5	1,0	0,8
		%	36	49	47	25	31
ПЛ	личинка	Зон/ФК	1,1	1,3	1,5	1,0	1,0
		%	33	28	27	29	42

Примечание к таблице: ФК – ферментный комплекс; ЗДЛ – зеленая дубовая листовертка; ПЛ – палевая листовертка.

изменчивости практически по всем группам ферментов. Исключение составляли только ферменты группы ФУС и ферменты, метаболизирующие эндогенные субстраты у имаго (см. табл. 2). Повышенная изменчивость ферментов с широкой субстратной специфичностью, метаболизирующих экзогенные субстраты, беспозвоночных и, в том числе, насекомых связывается с большим разнообразием условий существования, т.е. с субстратным разнообразием [2, 10]. Следовательно, меньшее количество локусов, детерминирующих ферменты группы ФШС палевой листовертки по сравнению с зеленой дубовой листоверткой, может свидетельствовать о том, что указанная группа ферментов палевой листовертки «имеет дело» с меньшим количеством субстратов. Кроме того, полученные нами данные указывают на большую степень специализации ферментов группы ФУС палевой листовертки. Так, при близком уровне изозимной изменчивости палевой и зеленой дубовой листоверток по локусам, кодирующим ФУС, процент полиморфных из них для палевой листовертки существенно ниже. С учетом того, что ферменты, составляющие группу ФЭС, принимают участие в процессе пищеварения, можно говорить о более глубокой пищевой специализации палевой листовертки.

Следует ожидать, что узкоспециализированные ферменты личинки палевой листовертки, метаболизирующие экзогенные субстраты, не смогут полноценно функционировать на фазе имаго. Поэтому, экспрессия одних и тех же локусов, кодирующих ФЭС, и на стадии личинки и на стадии имаго палевой листовертки несколько ниже по сравнению как с прочими группами ферментов данного вида, так и по сравнению с зеленой дубовой листоверткой. Интересно, что процент локусов, кодирующих ферменты с широкой субстратной специфичностью, экспрессированных на личиночной и имагинальной фазах палевой листовертки, близок к соответствующим показателям группы ФУС как палевой листовертки, так и зеленой дубовой листовертки. Это все еще раз, хотя и косвенно, указывает на больший уровень специализации ферментов с широкой субстратной специфичностью палевой листовертки.

ВЫВОДЫ

Таким образом, сравнительный анализ изозимной и аллозимной изменчивости одиннадцати ферментных систем зеленой дубовой и палевой листоверток позволил сделать следующие выводы :

1. У палевой листовертки в целом, а у личинок особенно, наблюдается более низкий, чем у зеленой дубовой листовертки уровень изозимной изменчивости практически по всем группам ферментов.

2. При близком уровне изозимной изменчивости палевой и зеленой дубовой листоверток по локусам, кодирующим ФУС, процент полиморфных из них для палевой листовертки существенно ниже.

3. Экспрессия одних и тех же локусов, кодирующих ФЭС, и на стадии личинки и на стадии имаго палевой листовертки несколько ниже по сравнению как с прочими группами ферментов данного вида, так и по сравнению с зеленой дубовой листоверткой.

4. Полученные данные подтверждают то, что палевая листовертка является более специализированным в плане выбора пищевого растения видом по сравнению с зеленой дубовой листоверткой.

Список литературы

1. Lewontin R.C. A molecular approach to the study of genetic heterozygosity in natural populations. 2. Amount of variations and degree of heterozygosity in natural populations of *Drosophila pseudoobscura* / R.C. Lewontin, J.L. Hubby // *Genetics*. – 1966. – V. 54. – P. 595–609.
2. Генетика изоферментов / [Л.И. Корочкин, О.Л. Серов, А.И. Пудовкин и др.]. – М.: Наука, 1977. – 278 с.
3. Яблоков А.В. Популяционная биология / А.В. Яблоков. – М.: Высш. шк., 1987. – 304 с.
4. Алтухов Ю.П. Генетические процессы в популяциях / Ю.П. Алтухов. – М.: Наука, 1983. – 279 с.
5. Компанийцев В.А. Некоторые особенности размножения листоверток *Tortrix viridana* и *Aleimma loeflingiana* (Lepidoptera, Tortricidae) / В.А. Компанийцев, А.В. Ивашов // *Вестник зоологии*. – 1993. – № 5. С. 79–82.
6. Симчук А.П. Свойства комплекса неспецифических эстераз дубовой зеленой листовертки / А.П. Симчук, А.В. Ивашов // *Укр. биохим. журн.* – 1990. – Т. 62, № 4. – С. 44–49.
7. Маурер Р.Г. Диск-электрофорез / Р.Г. Маурер. – М.: Мир, 1971. – 231 с.

8. Остерман Л.А. Исследование биологических макромолекул электрофокусированием, иммуноэлектрофорезом и радиоизотопными методами / Л.А. Остерман. – М.: Наука, 1983. – 304 с.
9. Успенская В.Д. Электрофорез белков в крахмальном и полиакриламидном гелях / В.Д. Успенская, Е.А. Николаев, М.Н. Смирнов // Современные методы в биохимии. – М.: Медицина, 1968. – С. 262–301.
10. Глазко В.И. Биохимическая генетика овец / В.И. Глазко. – Новосибирск: Наука, 1985. – 167 с.

Сімчук А. П., Івашов А. В. Порівняльний аналіз білкового поліморфізму зеленої дубової (*Tortrix viridana*) та палевої (*Aleimma loeflingiana*) листовійок // Екосистеми, їх оптимізація та охорона. Сімферополь: ТНУ, 2011. Вип. 5. С. 149–154.

Методом диск-електрофорезу були досліджені одинадцять ферментних систем личинок і імаго двох екологічно та еволюційно близьких видів – зеленої дубової листовійки (*Tortrix viridana* L.) і палевої листовійки (*Aleimma loeflingiana* Hub.). Згідно з отриманими даними, палева листовійка є видом, більш спеціалізованим в плані вибору харчової рослини в порівнянні із зеленою дубовою листовійкою. Про це свідчить той факт, що у палевої листовійки менша кількість ізозимів тих ферментів, які метаболізують екзогенні субстрати і, відповідно, менше локусів, що їх детермінують, в порівнянні із зеленою дубовою листовійкою, а частка поліморфних з них є нижчою в порівнянні з ферментами, не пов'язаними з травленням.

Ключові слова: генетична мінливість, ізоферменти, *Tortrix viridana*, *Aleimma loeflingiana*.

Simchuk A. P., Ivashov A. V. Comparative analysis of protein polymorphism in oak green (*Tortrix viridana*) and pale (*Aleimma loeflingiana*) leaf rollers // Optimization and Protection of Ecosystems. Simferopol: TNU, 2011. Iss. 5. P. 149–154.

Eleven enzymes of two ecologically and evolutionary close species, oak green (*Tortrix viridana* L.) and pale (*Aleimma loeflingiana* Hub.) leaf rollers were studied in larvae and adults using disc-electrophoresis method. As it has been found, pale leaf roller is more specialized in respect to selection of host plant in comparison with oak green leaf roller. This is supported by the fact that pale leaf roller has fewer isozymes of those enzymes, which metabolize exogenic substrates and, accordingly has fewer loci, which determine them in comparison with oak green leaf roller. Besides, these loci in pale leaf roller are less polymorphous in comparison with its enzymes, unrelated with digestion.

Key words: genetic polymorphism, isozymes, *Tortrix viridana*, *Aleimma loeflingiana*.

Поступила в редакцію 11.11.2011 г.