

ВЗАИМООТНОШЕНИЯ С ПАТОГЕНАМИ

УДК: 595.771 : 576.316.7 + 575.17 + 574.632

Ответ инверсионно-полиморфной популяции *Chironomus plumosus* и *Chironomus balatonicus* на инфицирование энтомопатогенной бактерией *Bacillus thuringiensis israelensis*

В. В. ГОЛЫГИНА, И. И. КИКНАДЗЕ, В. А. БУРЛАК

Институт цитологии и генетики СО РАН
630090 Новосибирск, просп. Акад. Лаврентьева, 10

Институт систематики и экологии животных СО РАН
630091 Новосибирск, ул. Фрунзе, 11

АННОТАЦИЯ

С целью выявления адаптивного значения инверсионного полиморфизма у комаров-звонцов личинок 4-го возраста *Chironomus plumosus* и *C. balatonicus* инфицировали энтомопатогенной бактерией *Bacillus thuringiensis* подвида *israelensis* (*Bti*). В исследованной популяции личинки *C. balatonicus* встретились с частотой ($31,7 \pm 3,0$) % и проявили повышенную чувствительность к обработке *Bti*: смертность личинок *C. balatonicus* составила ($70,7 \pm 7,1$) %, личинок *C. plumosus* – ($41,3 \pm 4,8$) %. Среди личинок *C. plumosus* наиболее восприимчивыми к заражению *Bti* оказались особи, гетерозиготные по инверсиям в плечах А и D. Взаимодействие инверсий, локализованных в разных плечах хромосом, при инфицировании *Bti* оценено как дифференцированная смертность особей с различными комбинациями генотипических сочетаний. Взаимодействия инверсий при инфицировании *Bti* были максимально выражены по комбинациям плеч А и D, минимально – по комбинациям плеч В и С. Обсуждаются сходства и различия последствий обработок *Bti* на хромосомный полиморфизм комара-звонца *C. plumosus* и малярийного комара *Anopheles messeae*, а также адаптивные свойства инверсионного полиморфизма у хирономид и анофелин.

Инверсионный полиморфизм широко распространен в природных популяциях хирономид (Diptera, Chironomidae) [1, 2], но экспериментальных доказательств его адаптивного значения имеется немного [3, 4]. Мы предприняли попытку изучения адаптивности хромосомного полиморфизма (ХП) хирономид путем инфицирования личинок 4-го возраста энтомопатогенной бактерией *Bacillus thuringiensis* подвида *israelensis* (*Bti*), которая часто применяется для ограничения численности природ-

ных популяций комаров и мошек – навязчивых кровососов и переносчиков многочисленных заболеваний человека.

Детальное изучение влияния *Bti* на хромосомно-полиморфные популяции малярийного комара *Anopheles messeae* показало, что гомо- и гетерозиготные по инверсиям особи имели неодинаковую восприимчивость к *Bti*. Чувствительность личинок, гомозиготных по альтернативным хромосомным последовательностям, также различалась [5]. Дифференцированная

восприимчивость к *Bti* у *A.messeae* при этом коррелировала с адаптивными свойствами инверсионного полиморфизма.

Другой аспект проблемы заключается в том, что хирономиды, анофелины и другие кулициды часто обитают в одних и тех же водоемах. Следовательно, обработки препаратами на основе *Bti* с целью профилактики гнуса могут привести не только к гибели хирономид, но и к изменению вектора отбора в их природных популяциях.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Личинки двух видов хирономид (*C.balatonicus* и *C.plumosus*) собраны в декабре 1996 г. в окрестностях ст. Речпорт, Новосибирск. В эксперимент отбирали не зараженных вирусами особей 4-го возраста без белых или радужных пятен на покровах. Личинок рассаживали по 50 особей в пластиковые кюветы 21 × 10 × 5 см, в которых содержалось 500 мл дехлорированной воды. Инфицирование проводили в трех повторностях в течение 24 ч при температуре 15–17 °С. Еще 2 повторности служили контролем. Финальная концентрация *Bti* (клон Р(36) из коллекции ИСиЭЖ СО РАН) составила 0,142 мг/мл. Погибших и выживших в опыте, а также контрольных личинок фиксировали в спирт-уксусной смеси (3 : 1). Давленные препараты политенных хромосом из слюнных желез готовили по стандартной ацеторсеиновой методике [1]. Картирование политенных хромосом проводили по системе Кейла и Деваи с соавторами [6, 7].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Смертность личинок хирономид от *Bti*.

Выборка хирономид в контроле и опыте содержала 2 вида комаров: *C.plumosus* (68,3 ± 3,0) % и *C.balatonicus* (31,7 ± 3,0) %. Проведенный эксперимент показал, что личинки *C.plumosus* и *C.balatonicus* по-разному реагировали на инфицирование *Bti*. Восприимчивость *C.balatonicus* (смертность (70,7 ± 7,1) %) оказалась почти вдвое выше, чем личинок *C.plumosus* (смертность (41,3 ± 4,8) %; $X^2 = 9,02$, f.d = 1, $p < 0,01$). В контроле гибели не было. Чувствительность личинок 4 видов малярийных комаров

к *Bti* варьировала в широких пределах [8], однако оказалась приблизительно на 3 порядка выше, чем восприимчивость хирономид в данном эксперименте. Отчасти это объясняется в 10–20 раз более высокой массой личинок хирономид, чем анофелин, а также сниженной температурой, при которой проводили настоящий эксперимент.

Генотипические сочетания последовательностей дисков (ГСПД) и эффект *Bti*. При инфицировании *Bti* у *C.plumosus* зафиксировано изменение частот встречаемости некоторых ГСПД. Такие изменения обнаружены в плечах А и D. Чувствительными к *Bti* оказались гетерозиготы pluA1.2 ($X^2 = 4,49$, f.d. = 1, $p < 0,05$), а также все гетерозиготы по плечу А (pluA1.2, pluA1.4, pluA2.4, pluA2.5, pluA2.7; $X^2 = 8,99$, f.d. = 1, $p < 0,01$). Гомозиготы pluA2.2 ($X^2 = 6,2$, f.d. = 1, $p < 0,05$) имели сниженную восприимчивость (рис. 1). По плечу D менее чувствительными к *Bti* оказались гомозиготы pluD1.1 и pluD2.2 ($X^2 = 5,73$, f.d. = 1, $p < 0,05$; рис. 2). У *C.balatonicus* также отмечена тенденция к сниженной восприимчивости гомозигот balD1.1 и balD2.2. В-хромосома чаще встречается у выживших личинок *C.plumosus* (13,1 %), чем у погибших (4,7 %). Эти данные соответствуют предположениям о том, что наличие В-хромосомы связано с устойчивостью к техногенным загрязнениям у мошек [9].

Гетерозиготы pluB1.2 оказывали влияние на выживаемость личинок *C.plumosus* в условиях аноксии [3, 4]. Расчет теоретических частот ГСПД плеча В по формуле Харди-Вайнберга

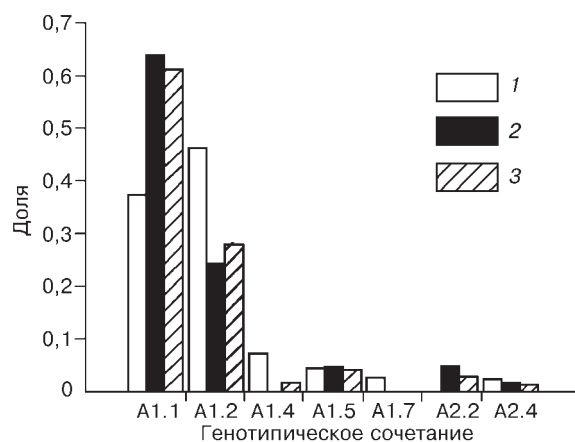


Рис. 1. Частота генотипических сочетаний последовательностей дисков по плечу А у погибших от *Bti* (1), выживших (2) и контрольных (3) личинок *C.plumosus*.

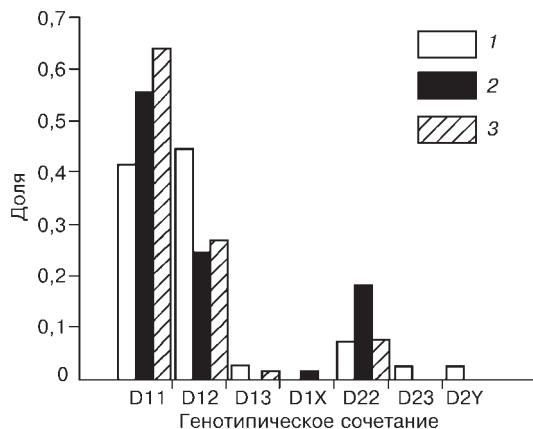


Рис. 2. Частота генотипических сочетаний последовательностей дисков по плечу D у погибших от *Bti* (1), выживших (2) и контрольных (3) личинок *C. plumosus*.

га показал наличие дефицита гетерозигот *pluB1.2* у выживших после инфицирования *Bti* и контрольных личинок *C. plumosus*. У погибших от *Bti* особей отмечено выравнивание частот ГСПД по плечу В (табл. 1). При этом гибель гетерозигот *pluB1.2* и гомозигот *pluB2.2* была одинакова (46,7 %) и не отличалась от смертности гомозигот *pluB1.1* (39,2 %). Следовательно, чувствительность к *Bti* и к недостатку кислорода у *C. plumosus* связана с разными хромосомными плечами и, по-видимому, не оказывала заметного взаимного влияния.

Комбинации инверсий в разных плечах хромосом и эффект *Bti*. С целью уточнения действия *Bti* на инверсионный полиморфизм *C. plumosus* анализировали смертность особей с различными сочетаниями инверсий в двух плечах. Анализ показал, что чувствительность к *Bti* дигомо-, моногетеро- и дигетерозигот по комбинациям наиболее "чувствительных" плеч А и D различалась (для дигомо- и моногетерозигот $\chi^2 = 10,52$, f.d. = 1, $p < 0,001$; для моно- и дигетерозигот $\chi^2 = 8,68$, f.d. = 1, $p < 0,01$). По комбинациям других плеч такие различия не выявлены, хотя в некоторых случаях гетерози-

готы оказывались чувствительнее гомозигот. По наименее "чувствительным" плечам В и С смертность особей с различными комбинациями генотипических сочетаний не различалась (табл. 2; рис. 3). Локализация полового фактора чаще всего наблюдалась на мономорфном плече F. Поэтому данные результаты указывают на существование аутомных взаимодействий при локализации инверсий в разных плечах у *C. plumosus*, которые проявились при низком уровне (40 %) смертности в эксперименте.

Ранее было показано, что существенное влияние на результаты эксперимента при инфицировании *Bti* личинок малярийных комаров *A. messeae* оказывала доза патогена, выраженная через смертность [1]. У *A. messeae* при гибели 40 % особей в условиях инфицирования *Bti* обнаружен эксцесс гетерозигот $2R_{01}$ и $3R_{01}$. Включающие половую хромосому комбинации $XL_{11}-2R_{01}$ при этом имели сниженную чувствительность, $XL_{11}-2R_{11}$ – повышенную. Дефицит гетерозигот и взаимодействие аутомных плеч (2R и 3L) у *A. messeae* проявлялись лишь при гибели 70 % особей от *Bti*. Инверсии по плечу XL половой хромосомы также коррелировали с чувствительностью *A. messeae* к *Bti* [5, 10]. В настоящем эксперименте при гибели 40 % особей *C. plumosus* от *Bti* обнаружился дефицит гетерозигот и взаимодействие по аутомным плечам А и D, т. е. популяция *C. plumosus* реагировала на *Bti* при 40 % гибели сходно по сравнению с реакцией популяции *A. messeae* при 70 % смертности.

Сходство реакции *A. messeae* и *C. plumosus* на инфицирование *Bti* проявлялось в наличии двух "чувствительных" аутомных плеч. Руководствуясь уровнем восприимчивости к *Bti*, можно провести аналогии между плечами А *C. plumosus* и 2R *A. messeae*, а также плечами D *C. plumosus* и 3L *A. messeae*. Данные аналогии могут иметь более глубокую функциональную взаимосвязь: на плечах А и D *C. plumosus*, а

Т а б л и ц а 1

Реальные (r) и теоретические (t) частоты генотипических сочетаний (ГСПД) в плече В у *C. plumosus*

ГСПД	Погибшие от <i>Bti</i>			Выжившие			Контроль		
	r	t	χ^2	r	t	χ^2	r	t	χ^2
<i>pluB1.1</i>	0,67 ± 0,07	0,57		0,74 ± 0,06	0,65		0,80 ± 0,05	0,71	
<i>pluB1.2</i>	0,16 ± 0,06	0,37	3,69 ^a	0,13 ± 0,04	0,32	4,99 ^b	0,09 ± 0,04	0,26	5,19 ^b
<i>pluB2.2</i>	0,16 ± 0,06	0,06		0,13 ± 0,04	0,04		0,11 ± 0,04	0,02	

П р и м е ч а н и е. χ^2 – значение хи-квадрат; a – $p > 0,05$; b – $p < 0,05$.

Смертность личинок *C. plumosus* с различными комбинациями инверсий при инфицировании *Bti*

Комбинация	Смертность, %	Комбинация	Смертность, %
A1.2-B1.1	58,6 ± 9,1	V1.1-C1.1	39,2 ± 6,8
A2.2-B1.1	28,6 ± 7,0	V1.1-C1.2	35,0 ± 10,7
A2.2-B2.2	27,3 ± 13,4	V1.2-C1.1	45,5 ± 15,0
Прочие (10)	50,0 ± 10,7	V2.2-C1.1	63,6 ± 14,6
A1.2-C1.1	57,7 ± 9,7	Прочие (5)	36,4 ± 14,6
A2.2-C1.1	31,4 ± 7,8	V1.1-D1.1	35,1 ± 7,8
A2.2-C1.2	27,8 ± 10,6	V1.1-D1.2	50,0 ± 9,8
Прочие (11)	48,0 ± 10,0	V1.1-D2.2	0
A1.2-D1.1	50,0 ± 11,2	V1.2-D1.1	30,0 ± 14,5
A1.2-D1.2	69,2 ± 12,8	Прочие (9)	58,3 ± 10,1
A2.2-D1.1	20,0 ± 8,0	C1.1-D1.1	39,5 ± 7,9
A2.2-D1.2	38,9 ± 11,5	C1.1-D1.2	60,0 ± 9,8
A2.2-D2.2	22,2 ± 13,9	C1.1-D2.2	11,1 ± 10,5
Прочие (16)	52,6 ± 11,5	C1.2-D1.1	23,1 ± 11,7
		Прочие (8)	47,4 ± 49,9

П р и м е ч а н и е. В скобках указано число комбинаций.

также 2R и 3L *A. messeae*, по-видимому, локализируются гены систем, связанных с признаком чувствительности – устойчивости особей этих видов к патогенам.

Зиготические комбинации последовательностей дисков (ЗКПД) и эффект *Bti*. Характер ХП у *C. plumosus* и *C. balatonicus* в данной популяции оказался сходным по плечам А, В, D и Е, различался – по плечам С у *C. plumosus* и G у *C. balatonicus* (табл. 3). Межвидовое сходство характера ХП, по всей видимости, отражает влияние условий среды, различие ука-

зывает на разделение (или комплементарность [11]) экологических ниш у данных видов, которое может быть выражено в особенностях физиологии, поведения или трофики у данных видов хирономид.

Комбинативный потенциал (возможное количество ЗКПД) у *C. plumosus* и *C. balatonicus*, рассчитанный из числа встреченных хромосомных последовательностей, оказался соответственно в 50 и 26 раз выше, чем у *A. messeae*, рассчитанного из ГСПД – в 5 и 12 раз. Несмотря на это, количество реально встреченных ЗКПД у *C. plumosus* (рис. 4) оказалось сопоставимо с таковым у *A. messeae* [12]. Число ЗКПД определяется частотой ХПс (или ГСПД) в популяции, а также объемом выборки. Относительная стабилизация числа ЗКПД у *A. messeae* (т. е. достижение примерно 95 % от числа ЗКПД в популяции) происходила в районе 300–320 особей [12]. Чтобы оценить реальное разнообразие ЗКПД у хирономид, эта цифра, по-видимому, должна быть увеличена в несколько раз. Разнообразие ЗКПД у *C. balatonicus* превышало таковое у *C. plumosus* приблизительно вдвое, хотя по теоретическим оценкам должно было вдвое ему уступать (см. табл. 3). Разнообразие ЗКПД у погибших от *Bti* личинок *C. plumosus* несколько превышало таковое у выживших (рис. 5). Этот результат соответствовал данным по инфицированию *Bti* *A. messeae*, у кото-

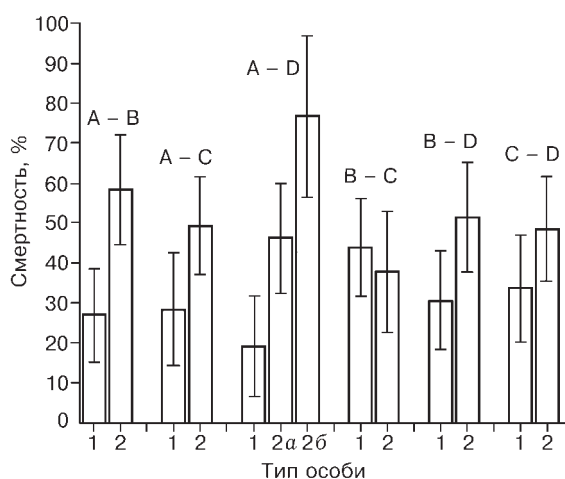


Рис. 3. Смертность личинок *C. plumosus* с комбинациями инверсий при инфицировании *Bti*. 1 – гомозиготы, 2 – гетерозиготы. Для комбинации А–D указаны: 2а – моногетерозиготы, 2б – дигетерозиготы. Указан 95%-й доверительный интервал.

Комбинативный потенциал у двух видов хирономид

Плечо	<i>C. plumosus</i>			<i>C. balatonicus</i>		
	n = 168	k = 48	b = 3,703	n = 78	k = 48	b = 5,435
	ХПс	МЧК	ВЧК	ХПс	МЧК	ВЧК
A	5	15	7	4	10	7
B	2	3	3	2	3	2
C	3	6	4	1	1	1
D	5	15	7	6	21	13
E	2	3	2	1	1	1
F	1	1	1	1	1	1
G	1	1	1	4	10	4
Всего	19	12150*	1176**	19	6300*	2912**

Примечание. ХПс – хромосомных последовательностей; МЧК – максимальное число комбинаций; ВЧК – встреченное число комбинаций.

* – число ЗК, рассчитанное из числа ХПс;

** – число ЗК, рассчитанное из числа ГСПД.

рых при гибели 40 % популяции количество ЗКПД также ненамного возросло [5].

При данном объеме выборки у *C. plumosus* ядро популяции [13] сформировали 11 ЗКПД, частота каждой из которых отличалась от 0 при $p = 0,05$. Доля ядра составила $(70,8 \pm 3,5) \%$. У *C. balatonicus* эти показатели составили соответственно 1 и $(7,7 \pm 3,0) \%$. Это указывает на наличие более сильных взаимодействий между инверсиями у *C. plumosus*, чем у *C. balatonicus*, и может быть следствием экологической субдоминантности *C. balatonicus* ($(31,7 \pm 3,0) \%$ от числа особей обоих видов) в данной популяции по отношению к *C. plumosus*.

Общие замечания. Сравнительный анализ полученных в настоящем эксперименте результатов, а также литературных данных показывает, что роль инверсионного полиморфизма

(ИП) у хирономид и анофелин различается. ИП малярийного комара *A. messeae* коррелировал с клинальной изменчивостью, плодовитостью самок, поведением личинок и их чувствительностью к *Bti* [1, 5, 10, 14–16]. У мотыля *C. plumosus* экспериментальные доказательства адаптивности ИП, за исключением связи с аноксией [3, 4], отсутствуют. Наиболее вероятным фактором, определяющим различную роль ИП у хирономид и анофелин, может быть среда обитания. Личинки хирономид и анофелин часто обитают в одних и тех же водоемах, однако занимают диаметрально противоположные участки в пространстве водоема. Хирономиды – типичные представители зообентоса, анофелины – зоопланктона. Жизнь хирономид протекает в отложениях детрита на дне водо-

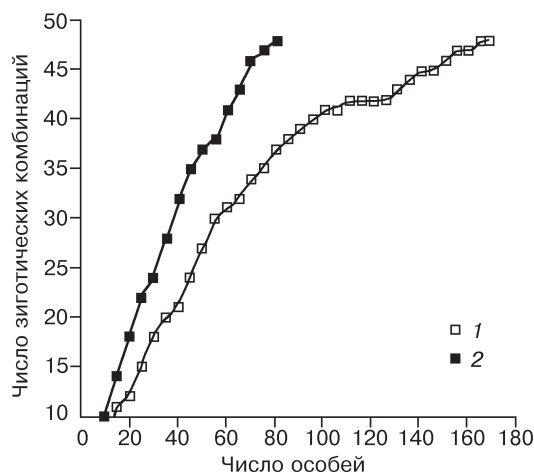


Рис. 4. Разнообразие зиготических комбинаций последовательностей дисков у *C. plumosus* (1) и *C. balatonicus* (2).

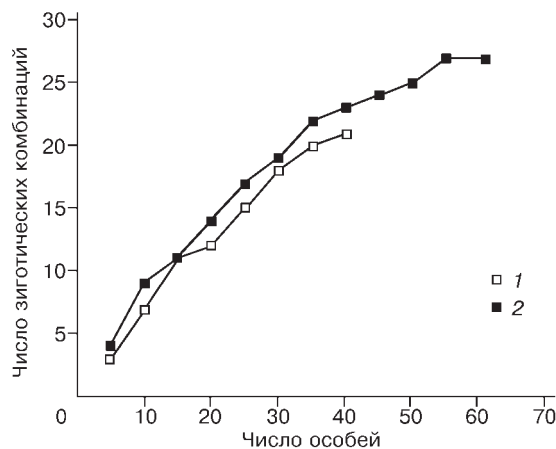


Рис. 5. Разнообразие зиготических комбинаций последовательностей дисков у погибших (1) и выживших (2) личинок *C. plumosus*.

емов, анофелин – у поверхностной пленки воды. Соответственно, влияние климатических факторов (перепады температур, усыхание и обводнение водоемов, осадки, солнечная радиация и др.) существенно сказывается на анофелинах, чем и объясняется сравнительно более выраженный адаптивный характер их ИП. Вероятно, с этим же связан сниженный комбинативный потенциал (число ЗКПД) в популяциях малярийных комаров, поскольку естественный отбор активнее элиминирует все "неудачные" инверсии. Среда обитания хирономид (ил на дне водоемов) более стабильна и располагает к "экспериментам природы" по части их ИП, что может коррелировать с повышенной восприимчивостью хирономид к внешним воздействиям. Экологические ниши, в которых обитают личинки хирономид, иные, чем ниши, занимаемые личинками малярийных комаров, что, вероятно, также сказывается на качестве ИП у этих групп двукрылых. Высокий уровень ИП хирономид, вероятно, указывает на отсутствие столь же жесткого отбора со стороны средовых факторов, что позволяет существовать особям с многочисленными комбинациями инверсий.

Следует отметить, что в литературе, посвященной хирономидам, практически не содержится сведений по связи кариотипического разнообразия хирономид с различиями микроклиматических условий или разнообразием экологических ниш в пределах одного водоема,

по системам спаривания и предпочтения выбора мест для откладки яиц самками хирономид с различными ЗКПД, жизнеспособности потомства и плодовитости самок с различными ЗКПД, питанию и поведению личинок с разными ЗКПД. Все это не позволяет более корректно интерпретировать накопленные к настоящему моменту данные по роли ИП у хирономид.

ЛИТЕРАТУРА

1. И. И. Кикнадзе, А. И. Шилова, И. Е. Керкис и др., Кариотипы и морфология личинок трибы Chironomini: Атлас, Новосибирск, Наука, Сиб. отд-ние, 1991.
2. И. И. Кикнадзе, А. Г. Истомина, Л. И. Гундерина и др., Кариотипы хирономид криолитозоны Якутии, Новосибирск, Наука, Сиб. отд-ние, 1996.
3. V. Pedersen, *Hereditas*, 1978, 89, 151–162.
4. V. Pedersen, *Ibid.*, 1984, 101, 75–77.
5. В. А. Бурлак, *Генетика*, 1997, **33**: 9, 1229–1235.
6. Н. Г. Keyl, *Chromosoma*, 1962, 13, 464–514.
7. G. Devai, M. Miskolczy, W. Wulker, *Acta Biol. Debr. Oecol. Hung.*, 1989, **2**: 1, 79–92.
8. В. А. Бурлак, Регуляция численности беспозвоночных и фитопатогенов, Новосибирск, 1997, 93–99.
9. Э. А. Качворян, Л. А. Чубарева, Н. А. Петрова, Л. С. Мирумян, *Генетика*, 1996, **32**: 5, 637–640.
10. В. А. Бурлак, М. И. Гордеев, *Экология*, 1996, **2**, 211–217.
11. М. Бигон, Дж. Харпер, К. Таусенд, *Экология, Особи, популяции и сообщества*, М., Мир, 1989, т. 2.
12. В. А. Бурлак, *Сиб. экол. журн.*, 1996, **3**: 6, 555–560.
13. В. А. Бурлак, Методические и методологические вопросы современной биологии и медицины, Томск, 1991, 71–77.
14. В. Н. Стегний, Популяционная генетика и эволюция малярийных комаров, Томск, Изд-во Том. ун-та, 1991.
15. В. А. Бурлак, *Паразитология*, 1998, **32**: 1, 11–20.
16. В. А. Бурлак, *Генетика*, 1998, **34**: 6, 749–756.

Response of an Inversion-Polymorphic Populations of *Chironomus Plumosus* and *Chironomus Balatonicus* to Infection by the Entomopathogenic Bacterium *Bacillus Thuringiensis Israelensis*

V. V. GOLYGINA, I. I. KIKNADZE, V. A. BURLAK

In order to elucidate the adaptive significance of inversion polymorphism in *Chironomus* species, 4th instar larvae of *Chironomus plumosus* and *C. balatonicus* were infected with *Bacillus thuringiensis* subspecies *israelensis* (*Bti*). In the population studied, larvae of *C. balatonicus* occurred with a frequency of 31.7 ± 3.0 % and showed a high sensitivity to *Bti* treatment: the death rate of *C. balatonicus* larvae was 70.7 ± 7.1 %, that of *C. plumosus* larvae was 41.3 ± 4.8 %. Among the larvae of *C. plumosus* the most susceptible to infection were individuals heterozygous with respect to inversions in arms A and D. The interaction of inversions localized in different arms of chromosomes was estimated in infecting with *Bti* as differential mortality of individuals with different genotypical combinations. Interaction of inversions in *Bti* infection was maximally expressed for combinations of A and D arms and minimally for combinations of B and C arms. Similarities and differences of consequences of *Bti* treatment for the chromosomal polymorphism of *C. plumosus* and *Anopheles messeae*, and the adaptive properties of inversion polymorphism in Chironomids and anophelines are discussed.