

УДК 595.752.2:576.316.2

Н.В. ВОРОНОВА, С.М. ВИШНЕВСКАЯ, С.В. БУГА

**КАРИОТИП *MACROSIPHUM KNAUTIAE* HOLMAN, 1972
(RHYNCHOTA: HOMOPTERA: APHIDIDAE)**

Chromosomal description of insects is a convenient marker for the species differentiation. In the present study karyotype of *M. knautiae* was specified and its features in the Belarusian population were described. The cell of *M. knautiae* encloses 12 chromosomes: 2 sexual (single in male) and 5 couples of autosomes. Chromosomal formula of the *M. knautiae*: 12, XX (X0), NF=24. There are not B-chromosomes in the *M. knautiae* cell.

В Беларуси на короставнике полевом (*Knautia arvensis* (L.) Coult.) отмечены два голоциклических вида тлей рода *Macrosiphum* Pass. [1, 2]. Двудомный *Macrosiphum rosae* (Linnaeus, 1759) мигрирует с шиповников и роз (*Rosa* L.) на различные валериановые (Valerianaceae), кипрейные (Onagraceae) и ворсянковые (Dipsacaceae), включая короставники (*Knautia* L.) [2]. Однодомный *Macrosiphum knautiae* Holman, 1972 развивается на *K. arvensis* и близких к нему представителях рода *Knautia* [2]. Для фауны Беларуси этот вид был отмечен на основе ряда регистраций на территории Белорусского Поозерья и Понеманья как *Macrosiphum silvaticum* Meier, 1985 [1]. В 2003 г. Р. Ракаускас [3] на основе анализа данных морфометрии для выборок *Macrosiphum* с *Knautia* из разных регионов Европы предложил рассматривать *M. silvaticum* в качестве младшего синонима *M. knautiae* Holman, 1972. В пользу этого свидетельствуют и молекулярно-биологические исследования [4]. Однако данная точка зрения пока не получила полной поддержки [2, 5]. Тем самым проблема уточнения таксономического статуса этих видов продолжает оставаться актуальной [4, 6].

Хромосомные данные длительное время используются в афидологических исследованиях как фундаментальный систематический признак для дифференциации видов и филогенетических построений [7]. При этом высокая скорость хромосомной эволюции у насекомых позволяет решать проблему систематики близких и криптических видов, труднодифференцируемых по морфологическим признакам [8]. Поскольку скорость отбора хромосомных перестроек значительно выше, чем аллельных вариантов генов, особенности хромосомного строения зачастую являются более удобными маркерами видовой дифференциации внутри монофилетических групп, чем молекулярно-генетические различия [4, 9].

Несмотря на обширные цитогенетические исследования тлей, охватывающие и представителей рода *Macrosiphum* [10], кариотип *M. knautiae* до сих пор не был описан. В связи с этим в задачи настоящего исследования входило определение хромосомной формулы *M. knautiae* и описание особенностей кариотипа на основе материала из Беларуси.

Методика исследования

Сбор *M. knautiae* был выполнен в 2008 г. в окрестностях д. Прилуки Минского р-на с *K. arvensis*, тлей культивировали в лабораторных условиях вплоть до завершения цикла (яйцекладки). Лабораторная культура, ведущая начало от основательниц, развившихся из перезимовавших яиц, была использована для получения клона К1. Клон К2 был получен в лабораторных условиях от партеногенетической самки из сбора, сделанного в июне 2009 г. с *K. arvensis* на территории памятника природы «Дубрава» (Минский р-н). Соотношение длины апикального сегмента хоботка к длине второго членика задней лапки у бескрылых живородящих самок (виргинопар) в экспериментальных выборках варьировало в диапазоне $1,26 \div 1,62$, что соответствует *M. knautiae* [3], в то время как для *M. rosae* характерен диапазон $0,92 \div 1,17$ [5].

Хромосомы выделяли по модифицированной методике [11]. Бескрылых партеногенетических самок вскрывали в капле солевого раствора Риннальдини (г/л): лимонная кислота – 0,676, KCl – 0,2, NaHCO₃ – 1,0, NaCl – 8,0, NaH₂PO₄ – 0,05, глюкоза – 1,0. Отбирали эмбрионы, не имеющие пигментированных глаз, и помещали в 0,75 % раствор KCl (100 мкл на 1 пробу), где инкубировали в течение 20 мин при $t=20$ °С. Затем надсадок отбирали, эмбрионы заливали 50 мкл фиксирующей жидкости (3 части метанола: 1 часть ледяной уксусной кислоты) и помещали пробы на 20 мин в морозильную камеру.

После удаления из пробы избытка фиксирующей жидкости клеточную суспензию наносили на предметное стекло и придавливали вторым предметным стеклом, что обеспечивало лучшее распределение тканевого гомогената по поверхности. Затем предметные стекла разделяли и высушивали в пламени горелки.

Препараты окрашивали на стекле с использованием 4 % красителя Гимза в фосфатном буфере Соренсена (г/л): Na₂HPO₄ – 11,9, KH₂PO₄ – 11,08, pH 6,8 в течение 10 мин.

В качестве дифференциального метода окраски применяли C-banding, позволяющий выявлять гетерохроматиновые участки хромосом [12]. Препараты выдерживали в 0,2 N HCl в течение 20 мин при обычных условиях, затем – в 5 % растворе Ba(OH)₂ в течение 5 мин при $t=60$ °С. Препараты отмывали в воде и выдерживали в 2×SSC (NaCl – 17,5 г/л, C₆H₅Na₃O₇×2H₂O – 8,82 г/л) 60 мин при тех же условиях. После этого препараты вновь отмывали и окрашивали по методу Гимза.

Препараты просматривали при 1000-кратном увеличении, метафазные пластинки фотографировали, измерения хромосом проводили с использованием программы ImageJ 1.39p. В ходе анализа особенностей хромосомного строения, кроме измерения абсолютных длин анализируемых компонентов, рассчитывались относительные длины хромосом (в процентах от суммарной длины хромосом диплоидного набора), центромерный индекс (процентное отношение длины короткого плеча хромосомы к ее общей длине), плечевой индекс (процентное отношение длинного плеча хромосомы к длине ее короткого плеча), суммарная доля гетерохроматина (отношение суммарной длины гетерохроматиновых участков хромосомы к ее общей длине) и процент мозаицизма (доля анеуплоидных клеток в общем числе проанализированных метафазных пластинок). Результаты в табл. 1–3 представлены как среднее ± стандартное отклонение.

Результаты и их обсуждение

В хромосомных препаратах тлей обоих клонов преобладали метафазные пластинки, содержащие набор из 6 пар хромосом (табл. 1, рис. 1 а). Поскольку механизм определения пола у тлей известен и осуществляется по схеме XX–X0, хромосомная формула *M. knautiae*: 12, XX (X0), NF=24.

Таблица 1

Хромосомное число *Macrosiphum knautiae* Holman, 1972

Исследуемый клон (число особей)	Общее число проанализированных метафазных пластинок	Количество (процент) метафазных пластинок, имеющих определенное число хромосом					
		2n=8	2n=9	2n=10	2n=11	2n=12	2n=13
K1 (56)	264	13 (4,92%)	9 (3,41%)	24 (9,09%)	29 (10,98%)	187 (70,83%)	2 (0,76%)
K2 (12)	53	2 (3,77%)	2 (3,77%)	3 (5,66%)	7 (13,21%)	39 (73,58%)	0 (0%)

Диплоидный набор представлен 2 крупными и 10 хромосомами средних размеров, подробная хромосомная формула *M. knautiae*: 2L_v+2M_v+2M_{sv}+4M_v+2M_{st}.

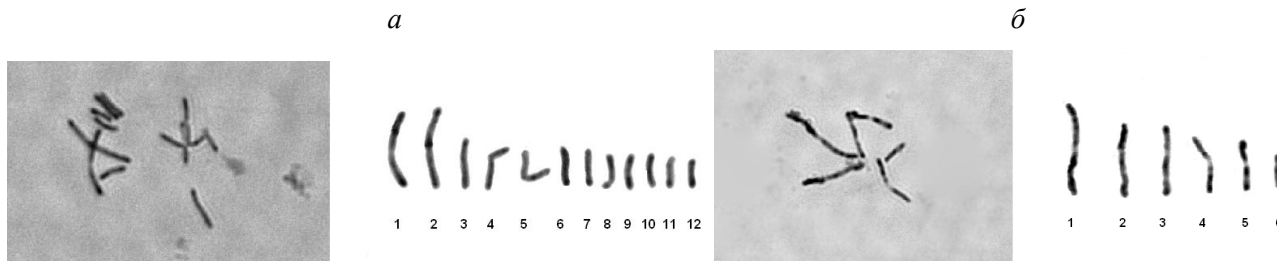


Рис. 1. Метафазные пластинки и идиограмма *Macrosiphum knautiae* Holman: 1972 а – диплоидный (рутинное окрашивание), б – гаплоидный (C-banding) хромосомный набор

За исключением первой крупной пары, хромосомы представляют собой плавно убывающий размерный ряд (табл. 2).

Хромосомная характеристика *Macrosiphum knautiae* Holman, 1972

Хромосомы, пара	Суммарная длина хромосом в диплоидном наборе, мкм	Тип	Абсолютная длина, мкм	Относительная длина, %	Центромерный индекс, %	Плечевой индекс, %
1	35,143±4,68	V	5,28±0,94	15,03±0,58	46,15±2,34	100,45±2,61
2		sV	3,34±0,26	9,51±1,02	36,34±3,86	157,55±3,87
3		sV	2,77±0,36	7,89±0,93	34,08±1,95	173,98±2,96
4		V	2,36±0,28	6,71±1,15	41,02±3,75	96,24±4,61
5		V	2,05±0,25	5,84±1,01	45,94±2,67	109,51±6,12
6		sT	1,76±0,21	5,01±0,62	23,29±1,74	285,85±1,98

Методом С-окрашивания выявлялись ярко выраженные гетерохроматиновые участки в прицентромерных и теломерных участках хромосом (рис. 1 б). Содержание С-гетерохроматина в митотических хромосомах исследуемых тлей оказалось довольно велико (табл. 3).

Таблица 3

Содержание конститутивного гетерохроматина в хромосомах *Macrosiphum knautiae* Holman, 1972

Хромосомы, пара	Длина теломерного участка p, мкм	Длина теломерного участка q, мкм	Длина прицентромерного участка p, мкм	Длина прицентромерного участка q, мкм	Суммарная доля гетерохроматина, %
1	0,74±0,1	0,63±0,1	0,64±0,1	0,31±0,1	44,27±2,61
2	0,59±0,2	0,52±0,1	0,27±0,2	0,51±0,1	57,20±5,43
3	0,31±0,1	0,44±0,1	0,27±0,1	0,31±0,2	48,51±4,98
4	0,45±0,3	0,56±0,2	0,29±0,1	0,24±0,1	66,25±6,12
5	0,40±0,1	0,30±0,1	0,22±0,2	0,38±0,1	64,08±3,67
6	0,19±0,1	0,25±0,3	0,09±0,1	0,25±0,1	45,89±3,05

Существуют работы [13], указывающие, что конститутивный гетерохроматин в митотических хромосомах тлей регистрируется в основном в теломерных и интерстициальных участках X-хромосом, в то время как аутосомы обычно бедны гетерохроматином. Однако результаты настоящего исследования показали, что у *M. knautiae* наибольшее процентное содержание гетерохроматина отмечалось в 4-й и 5-й хромосомной паре. Положение участков более плотной спирализации хромосом было константным во всех исследованных метафазных пластинках, но размеры С-гетерохроматиновых зон варьировали, что не всегда позволяло использовать данный кариологический признак для идентификации отдельных хромосом.

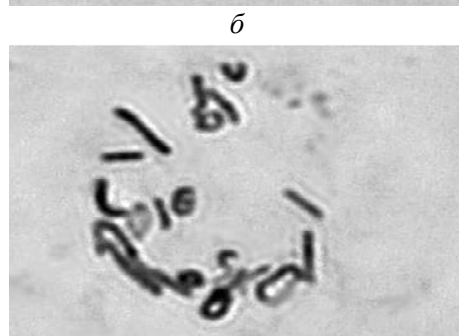
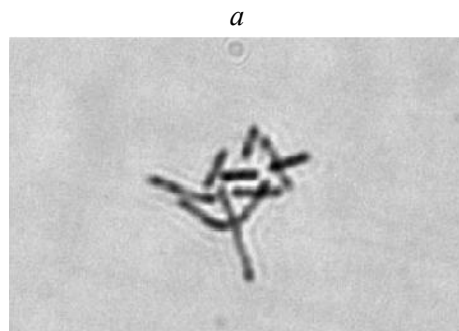


Рис. 2. Анеуплоидия (а) и хромосомные aberrации (б) в клетках *Macrosiphum knautiae* Holman, 1972

В клетках исследуемых клонов *M. knautiae* не было обнаружено В-хромосом. Хотя доля метафазных пластинок, включавших более 12 характерно окрашивающихся фрагментов, была велика, эти дополнительные элементы различались по размеру, из-за чего были классифицированы как обломки хромосом основного набора.

Тем не менее процент анеуплоидий оказался достаточно высоким (см. табл. 1), преимущественно за счет гипоплоидий. Большинство анеуплоидных клеток (около 20 %) были лишены 1–2 хромосом из числа аутосом среднего размера (рис. 2 а).

Процент мозаицизма, таким образом, составил 27,58 %. Его можно признать высоким, поскольку принято считать, что нормальной долей анеуплоидов является 2–3 % от числа исследованных клеток [14]. Работы последних лет показывают, что высокий процент мозаицизма характерен как для тлей в целом [11], так и для многих других животных, особенно в популяциях, подвергающихся высокой антропогенной нагрузке [15].

Среди других хромосомных нарушений, выявленных в клетках эмбрионов *M. knautiae*, преобладали хромосомные кольца, преимущественно ацентрические (рис. 2 б). Обычно метафазные пластинки, имеющие такого рода нарушения, содержали не более одного хромосомного кольца. Общая доля клеток, содержащих кольца, составила 12,63 %.

* * *

Клетки *M. knautiae* содержат 12 хромосом: 2 половых (1 у самцов) и 5 пар аутосом. Хромосомная формула *M. knautiae*: 12, XX (X0), NF=24.

Частота анеуплоидов в белорусской популяции высока и достигает 27 % исследованных клеток. Частота других хромосомных нарушений (хромосомные кольца, хромосомные фрагменты) также значительна, что обычно характерно для популяций, обитающих на территориях, подвергающихся интенсивной антропогенной нагрузке.

Авторы выражают глубокую благодарность доктору биологических наук В.Г. Кузнецовой (ЗИН РАН, г. Санкт-Петербург) и докторанту Е. Басиловой (кафедра зоологии Вильнюсского университета) за консультационную помощь по вопросам кариологических исследований тлей.

Работа частично выполнена при финансовой поддержке БРФФИ (грант Б09МС-036).

1. Buga S., Rakauskas R. // Acta Zoologica Lituanica. 2003. Vol. 13. № 3. P. 396.
2. Holman J. // Host plant catalog of aphids. Palaearctic region. Berlin, 2009.
3. Rakauskas R. // Mitt. Mus. Nat. kd. Berl., Dtsch. Entomol. Z. 2003. Vol. 50. № 2. P. 181.
4. Turcinaviciene J., Rakauskas R. // Redia. 2009. Vol. 92. P. 105.
5. Blackman R.L., Eastop V.F. // Aphids on the World's Herbaceous Plants and Shrubs. Chichester, 2006.
6. Rakauskas R. // Ekologija (Vilnius). 2003. № 1. P. 3.
7. Blakman R.L. // Syst. Entomol. 1989. Vol. 14. P. 7.
8. Blakman R.L., Brown P.A., Ramirez C.C., Niemeyer H.M. // Heredity. 2003. Vol. 84. P. 254.
9. Лухтанов В.А., Кузнецова В.Г. // Журн. общ. биологии. 2009. Т. 70. № 5. С. 415.
10. Кузнецова В.Г., Шапошников Г.Х. // Энтомологическое обозрение. 1973. Т. 52. Вып. 1. С. 116.
11. Basilova J., Turcinaviciene J., Rakauskas R. // Ekologija. 2008. Т. 54. № 4. P. 256.
12. Картавцева И.В. // Кариосистематика лесных полевых мышей (Rodentia: Muridae). Владивосток, 2002.
13. Mandrioli M., Ganassi S., Bizzaro D., Manicardi G.C. // Hereditas. 1999. Vol. 131. P. 185.
14. Беляев Д.К., Волобуев В.Т., Раджабли С.И., Трут Л.Н. // Генетика. 1974. Т. 10. № 2. С. 58.
15. Кайбелева Э.И., Завьялов Е.В., Табачишин В.Г. // Изв. Самар. науч. центра РАН. 2009. Т. 11. № 1 (2). С. 65.

Поступила в редакцию 15.03.10.

Нина Владимировна Воронова – аспирант кафедры зоологии. Научный руководитель – С.В. Буга.

Светлана Михайловна Вишневская – сотрудник Регионального центра коллективного пользования исследовательским оборудованием и приборами МГУ им. А.А. Кулешова.

Сергей Владимирович Буга – доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой зоологии.