

61:00-3/188-X

ИНСТИТУТ ОБЩЕЙ ГЕНЕТИКИ им. Н.И. ВАВИЛОВА РАН

на правах рукописи

ЗИНКЕВИЧ НАТАЛЬЯ СЕРГЕЕВНА

УДК 575.13:579.23:591.33

**НАСЛЕДУЕМАЯ БЕССАМЦОВОСТЬ У ДВУХ ВИДОВ
КОКЦИНЕЛЛИД -
ADALIA VIPUNCTATA L. И *HARMONIA AXYRIDIS* PALL.**

03.00.15 - генетика

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научный руководитель
д.б.н., проф. И.А. Захаров

МОСКВА
1999

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	
1.1 Жуки семейства Coccinellidae	7
1.2. Генетика и биология кокциnellид	8
1.2.1. <i>Adalia bipunctata</i>	8
1.2.2. <i>Harmonia axyridis</i> как генетический объект	8
1.2.2.1. Биология <i>Harmonia axyridis</i>	8
1.2.2.2. <i>Harmonia axyridis</i> как модельный объект в различных областях биологии	12
1.2.2.3. Кариотип <i>Harmonia axyridis</i>	13
1.2.2.4. Феногеография <i>Harmonia axyridis</i> , полиморфизм по окраске	13
1.2.2.5. Бессамцовость у <i>Harmonia axyridis</i>	18
1.3. Спироплазма как андроцидная бактерия	19
1.3.1. Молликуты	19
1.3.2. Род Спироплазма	22
1.3.2.1. Классификация и таксономия спиетроплазм	24
1.3.2.2. Спиетроплазма и бессамцовость	26
1.3.2.3. Вирусы спиетроплазм	34
Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	
2.1. Насекомые	38
2.2. Методы культивирования насекомых	38
2.3. Методы выделения бессамцовых линий и определение соотношения полов в популяциях	39
2.4. Методы световой микроскопии эмбрионов	39
2.5. Методы световой микроскопии овариол	41
2.6. Методы электронно-микроскопического анализа	41
2.7. Выделение ДНК	44
2.8. Полимеразная цепная реакция	45
2.9. Электрофорез	45
2.10. Определение последовательности нуклеотидов (секвенирование)	46
2.11. Филогенетический анализ	46

2.12. Статистические методы	47
Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ	
3.1. Вторичное соотношение полов в новосибирской популяции <i>Harmonia axyridis</i> . Соотношение полов в семьях и выделение бессамцовых линий у собранных в природе жуков <i>Harmonia axyridis</i>	48
3.2. Соотношения полов в популяциях <i>Adalia bipunctata</i> и изменчивость числа овариол у самок	53
3.3. Развитие эмбрионов кокциnellид при заражении андроцидными бактериями	63
3.3.1. Нормальный ход эмбриогенеза у кокциnellид	65
3.3.2. Особенности эмбриогенеза <i>Adalia bipunctata</i> в бессамцовых семьях	66
3.3.3. Особенности эмбриогенеза <i>Harmonia axyridis</i> в бессамцовых семьях	69
3.4. Микроскопическое изучение яичников инфицированных и неинфицированных самок кокциnellид	77
3.4.1. Морфология яичников и овариол	77
4.2. Состояние фолликулярного эпителия	88
3.5. Идентификация бактерии, вызывающей явление бессамцовости у <i>Harmonia axyridis</i>	88
ОБСУЖДЕНИЕ	91
ВЫВОДЫ	106
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	107

Введение

Актуальность проблемы. Симбиотические микроорганизмы чрезвычайно широко распространены в природе. До недавних пор возможности их изучения ограничивались неспособностью симбионтов к росту вне организма хозяина. Последние достижения молекулярной биологии дали новые подходы к изучению таких симбионтов. В настоящее время проводится анализ ряда симбиотических систем, которые были описаны много лет назад, но исследование которых до сих пор представляло известные сложности.

Большой интерес вызывает способность наследуемых симбионтов модифицировать размножение хозяина таким образом, чтобы получать оптимальные возможности для своего распространения. У представителей различных групп членистоногих цитоплазматически наследуемые микроорганизмы могут вызывать партеногенез, феминизацию, цитоплазматическую несовместимость при скрещиваниях и гибель мужских эмбрионов. Известны два типа явлений, связанных с гибелью самцов: ранняя гибель эмбрионов или личинок первой стадии (обнаружена у многих групп насекомых и клещей) и поздняя гибель личинок четвертой стадии (обнаружена только у кровососущих комаров в результате пролиферации микроспоридий).

Бактерии, принадлежащие к родам *Wolbachia*, *Rickettsia* и *Spiroplasma*, способные вызывать отклонения от нормального соотношения полов у насекомых и клещей, индуцируют значительные изменения в популяциях своих хозяев и тем самым могут изменять направление эволюционных процессов, происходящих в этих популяциях. Механизмы, приводящие к элиминации самцов на разных стадиях эмбриогенеза, остаются пока мало изученными.

После первой работы Я.Я. Луса (19476), выполненной на *Adalia bipunctata*, для пяти других видов божьих коровок (*Coleoptera: Coccinellidae*) было описано явление цитоплазматически наследуемого отклонения от нормального соотношения полов, вызванного гибелью самцов на стадии яйца. В некоторых случаях вызывающие наследуемую бессамцовость бактерии были идентифицированы, в других (например, у *Harmonia axyridis*) - нет.

Дальнейшее изучение внутриклеточных симбионтов божьих коровок позволит получить дополнительную информацию о морфологических проявлениях действия бактерий на разных стадиях оогенеза и эмбриогенеза. Визуализация процессов, сопровождающих гибель самцов, является необходимым условием для понимания механизмов, вызывающих явление бессамцовости и того, как подобные механизмы могли возникнуть в процессе эволюции.

В связи с вышесказанным представлялось актуальным провести более глубокое изучение некоторых особенностей явления бессамцовости у двух видов кокциnellид – *Harmonia axyridis* и *Adalia bipunctata*.

Цели и задачи исследования. Целью данной работы являлось исследование явления бессамцовости в российских популяциях азиатского вида *Harmonia axyridis*, сравнительное изучение цитоморфологических проявлений наследуемой бессамцовости у двух видов кокциnellид *Adalia bipunctata* и *Harmonia axyridis*. В работе были поставлены следующие конкретные задачи:

- определение вторичного соотношения полов в новосибирской популяции *Harmonia axyridis*;
- выделение бессамцовых линий у *Harmonia axyridis*;
- идентификация бактерий, вызывающих андроцидный эффект в сибирских популяциях *Harmonia axyridis*;
- исследование соотношений полов у *Adalia bipunctata* в популяциях Москвы, Санкт-Петербурга и Ленинградской области;
- электронно-микроскопическое изучение трансовариальной передачи бактерий в семьях *Adalia bipunctata* и *Harmonia axyridis*;
- определение стадии и морфологических проявлений гибели мужских эмбрионов *Adalia bipunctata* и *Harmonia axyridis*.

Научная новизна. Впервые учтено вторичное половое соотношение в одной из популяций *Harmonia axyridis* и показано наличие в сибирских популяциях этого вида самок, в потомстве которых отсутствуют самцы. Впервые показано, что бессамцовость в популяциях *Harmonia axyridis* может вызываться симбиотическими цитоплазматически наследуемыми бактериями класса *Mollicutes* рода *Spiroplasma*. Установлено, что эта

бактерия филогенетически не связана с ранее описанной спироплазмой, вызывающей нарушения в соотношении полов у *Drosophila*. Показано, что спироплазма, выделенная нами из *Harmonia axyridis*, филогенетически близка к спироплазме, вызывающей явление бессамцовости в популяциях *Adalia bipunctata*, но данные бактерии не являются идентичными. Проведено изучение морфопатологии мужских эмбрионов *Adalia bipunctata* и *Harmonia axyridis* и впервые идентифицированы стадии, на которых происходит остановка развития. Впервые изучено состояние яичников инфицированных самок.

Практическая ценность. Микроорганизмы, модифицирующие половой процесс хозяина, могут найти практическое использование в качестве агентов биологического контроля численности и/или полового состава в популяциях вредных и полезных видов насекомых; наличие или отсутствие отклонения от нормального соотношения полов в популяциях насекомых может служить своеобразным тестом на благополучие (или неблагополучие) данной экосистемы в целом.

Апробация работы. Основные материалы работы доложены на семинаре кафедры эмбриологии биологического факультета МГУ (25 марта 1999 года) и на Конференции молодых ученых и аспирантов ИОГен РАН и кафедры генетики и селекции биологического факультета МГУ (16 ноября 1999 года).

Публикации. По теме диссертации опубликована 1 научная работа, находятся в печати 1 научная работа и тезисы, представленные на 2-ой съезд ВОГиС.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 126 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, результатов собственных исследований, обсуждения, выводов, списка литературы (48 отечественных и 221 зарубежный источник). Работа содержит 11 таблиц и иллюстрирована 25 рисунками.

1. Обзор литературы

1.1 Жуки семейства *Coccinellidae*

Семейство божьи коровки, или кокцинеллиды (*Coccinellidae*), относится к отряду жесткокрылые, или жуки (*Coleoptera*), подотряду разноядные (*Polyphaga*), серии кантароидные, или разноусые (Бей-Биенко, 1980). Представители этого семейства - небольшие округлые, сверху выпуклые жуки, нередко ярко окрашенные. Ротовые органы грызущего типа, антенны короткие и булабовидные. Лапки сильно склеротизированы, состоят из 4 члеников (3-ий членик крайне мал).

Метаморфоз полный. Личинки характеризуются четко ограниченной головной капсулой, грызущим ротовым аппаратом, антеннами и грудными ногами, но без брюшных конечностей (Шванвич, 1949). Личинки ведут, как и имаго, хищный образ жизни; лишь представители подсемейства *Epilachninae* растительноядны. Окукливание происходит на растениях, куколка висит вниз головой. Куколки снабжены прижатыми к телу имагинальными придатками, с телом, однако, не срастающимися (Бей-Биенко, 1980).

Хищные коровки по объектам питания разделяются на три группы: питающиеся тлями (тлевые коровки или афидофаги), кокцидами (кокцидофаги) и паутиными клещами (акарифаги) (Савойская, 1991). Хищные виды используются в биологической борьбе с вредителями растений. Из таких хищников наиболее известна родолия (*Rodolia cardinalis* Muls.) - вид австралийского происхождения, интродуцированный в Калифорнию и другие цитрусовые районы мира для борьбы с вредителем цитрусовых желобчатым червецом (*Icerya purchasi* Mask.). Родолия оказалась очень эффективной в уничтожении червца (Росс и др., 1985).

Среди местных полезных видов обычны семиточечная коровка (*Coccinella septempunctata* L.) и двухточечная адалия (*Adalia bipunctata* L.), истребляющие тлей и отчасти кокцид.

Из растительноядных видов в Средней Азии сильно вредит бахчевым культурам бахчевая коровка (*Epilachna chrisomelina* F.), а на Дальнем Востоке повреждает пасленовые и тыквенные культуры картофельная коровка (*E. vigintioctomaculata* Motsch) (Бей-Биенко, 1980).

1.2. Генетика и биология кокциnellид

1.2.1. *Adalia bipunctata*

Генетика большинства видов кокциnellид изучена плохо или не изучена вовсе. Наиболее активно исследуемым в экспериментальной генетике объектом является *Adalia bipunctata* L. Род *Adalia* включается в то же подсемейство и трибу (Coccinellinae, Coccinellini), что и такие известные роды, как *Coccinella*, *Harmonia*. *A. bipunctata* широко распространена в Европе, Азии, Северной Америке. Адалии легко культивируются в лабораторных условиях. Наиболее подходящим кормом для нее являются гороховая тля (*Acyrtosiphon pisum*) и злаковая тля (*Schizaphis graminum*). К настоящему времени хорошо изучена генетика окраски адалий, проведены многочисленные исследования по механизмам поддержания полиморфизма, генетике полового отбора. Подробнее результаты этих исследований здесь не описаны, так как они представлены в недавно опубликованном обзоре (Захаров, 1995).

1.2.2. *Harmonia axyridis* как генетический объект

Среди многих видов хищных кокциnellид одно из важных мест по численности и хозяйственному значению занимает *Harmonia axyridis* Pall. Представители данного вида - крупные жуки, длиной до 5,5-7мм, полушаровидной формы, чрезвычайно вариабельные по окраске. Яйца желтые. Личинки в старших возрастах крупные, длиной до 12мм, очень ярко окрашенные - черные, с большими оранжевыми пятнами. Куколка (длина 4,5-5,5мм) оранжевая с продолговатыми черными пятнами.

1.2.2.1. Биология *Harmonia axyridis*

H. axyridis является энтомофагом с широким набором приспособительных реакций. Для данного вида характерны две генерации в год, при благоприятных климатических условиях возможны три. Спаривание у жуков начинается в середине апреля при температуре 16-18°C (Савойская, 1974). Весной многие виды кокциnellид активно питаются пыльцой и нектаром цветущих растений, но к яйцекладке приступают, лишь когда появляются тли. *H. axyridis* при оптимальных условиях температуры и влажности, обильной углеводной пище вообще не откладывает яиц (Савойская, 1983). Исследованиями, проведенными в лаборатории, выяснено, что часть популяции (до 15-

20%) *H. axyridis* живет полных три года, не теряя даже на третий год своей активности и плодовитости (Савойская, 1974). Эти данные также свидетельствуют о высоком экологическом потенциале вида.

В природных популяциях число яиц в одной кладке колеблется от 11 до 52, в среднем оно равняется 20 (Савойская, 1991). Плодовитость хармонии зависит от специфичности пищи, ее количества, а также от температуры и относительной влажности воздуха (Савойская, 1983). Для жуков данного вида характерна большая продолжительность яйцекладки: у перезимовавших жуков она длится 70-73 дня, у жуков первого поколения немногим более месяца (Савойская, 1974). Наименее продолжительная яйцекладка у жуков первого поколения нынешнего года, которые составляют основную массу особей, переживающих зиму в состоянии диапаузы. Именно эта часть популяции, дающая на будущий год наиболее обильную яйцекладку, является главной в существовании вида, а остальные резервными. У большинства жуков второго поколения в первое лето их жизни яйцекладки не бывает (Савойская, 1974).

Интересной закономерностью является то, что у жуков различных поколений и разной продолжительности жизни наблюдается два пика в яйцекладке. У *H. axyridis* наблюдается наложение во времени одного поколения на другое, а также совмещение яйцекладки разных поколений (Савойская, 1991). В середине лета вид очень многочислен и представлен перезимовавшими жуками, заканчивающими яйцекладку, личинками, а также жуками первого поколения, у которых яйцекладка в разгаре, и отродившимися жуками второго поколения. Совмещение сроков развития и яйцекладки разных поколений дает возможность виду быстро восстанавливать свою численность. Таким образом, хармония обладает отчетливо выраженной высокой потенциальной скоростью роста популяции (Савойская, 1974).

H. axyridis, как и многим другим кокцинеллидам, свойственна эстивация: в середине лета жуки улетают в горы или собираются небольшими скоплениями в увлажненных местах на равнинах и впадают в неактивное состояние (Савойская, 1960). В дальнейшем было выяснено, что эстивация вызывается в основном недостатком пищи (Савойская, 1983). Эта же особенность отмечена для некоторых видов кокцинеллид юго-восточной Франции (Ongagna, Iperiti, 1994).

Зимуют жуки на стадии имаго, иногда забираясь на глубину до 1,5м, хорошо переносят понижение температуры до -10°C (Воронин, 1965). На зимовках хармонии большую часть времени находятся в состоянии имагинальной диапаузы. Ф.Г. Добржанский (1922) отмечал большое значение периода диапаузы для божьих коровок, поскольку в течение этого периода они обладают способностью к весьма продолжительному голоданию. Имагинальная диапауза продолжается все то время (с конца лета по конец весны), когда главная пища божьих коровок - тли - отсутствует или редка. А период созревания яичников у кокциnellид, во время которого коровки нуждаются в наибольшем количестве животной пищи, приходится на период середины лета – время, наиболее изобилующее тлями.

Установлено, что вся имагинальная фаза чувствительна к фотопериоду - основному фактору, вызывающему диапаузу. Пороговый фотопериод при формировании диапаузы и при реактивации одинаков (Заславский, Богданова, 1965). Реактивация осуществляется высокой температурой и длинным днем. Создавая необходимые термические и фотопериодические условия, можно искусственно вызвать или прервать диапаузу (Ongagna, Iperiti, 1994). Жуки хармонии не улетают далеко от мест питания и зимовки (Nalepa et al., 1996).

Гистологическое изучение половой системы зимующих жуков *H. axyridis* было начато Ф.Г. Добржанским (1922), позднее продолжено К.Е. Ворониным (1966). Проведенные исследования показали, что в течение диапаузы жуки *H. axyridis* имеют сильно развитое жировое тело, занимающее всю брюшную полость. Гранулы жирового тела густо облегают яичники, отчего последние трудно заметны. У большинства самок яичники совершенно прозрачны, а их размеры и состояние такие же, как у только что отродившихся. Самцы зимуют с заполненными семенными пузырьками (Воронин, 1966).

Самец может спариваться с самкой хармонии независимо от того, оплодотворена она или нет (Obata, 1986). Самки обычно крупнее самцов. Коровкам вида *H. axyridis* свойственен половой диморфизм: у самок голова черная, с небольшим белым пятном на лбу, у самцов голова белая.