

61:04-3/1434

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК
ИНСТИТУТ ОБЩЕЙ ГЕНЕТИКИ ИМ. Н. И. ВАВИЛОВА

на правах рукописи

УДК 575. 86: 595.763.79

Паленко Мария Владимировна

**МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ФИЛОГАНИИ ЖУКОВ СЕМЕЙСТВА
COCCINELLIDAE**

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Специальность

Генетика – 03. 00. 15

Научный руководитель:
доктор биологических наук,
ведущий научный сотрудник
Муха Д. В.

Москва – 2004 год

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	7
1.1. Объект исследований	7
1.1.1. Краткая характеристика семейства Coccinellidae	7
1.1.2. Полиморфизм вида <i>Adalia bipunctata</i>	9
1.2. Особенности эволюции мтДНК насекомых	14
1.2.1. Свойства мтДНК	14
1.2.2. Различия в скорости эволюции синонимичных и несинонимичных сайтов	15
1.2.3. Филогения видов на основе изучения мтДНК	25
1.3. Изменчивость рДНК в эволюции эукариот	35
1.4. Методы филогенетического анализа	38
2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	42
2.1.1. Выделение ДНК	42
2.1.2. Электрофорез	43
2.1.3. Амплификация	43
2.1.4. Получение очищенных ПЦР продуктов	44
2.1.5. Лигирование	44
2.2. Трансформация клеток <i>E. coli</i>	45
2.2.1. Приготовление компетентных клеток	45
2.2.2. Трансформация компетентных клеток	45
2.2.3. Выделение плазмидной ДНК и очистка для идентификации истинных рекомбинантов	46
2.2.4. Рестрикция рекомбинантных плазмид для установления длины вставки	47
2.3. Секвенирование	47

2.3.1. Подготовка секвенирования и фореа для секвенирования	47
2.3.2. Приготовление реакционной смеси (на одну реакцию)	49
2.4. Компьютерный анализ	50
3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	
3.1. Анализ первичной структуры 3'-области гена субъединицы I цитохромоксидазы десяти видов кокцинеллид	51
3.1.1. Клонирование и анализ первичной последовательности фрагмента гена цитохромоксидазы I десяти видов божьих коровок	51
3.1.2. Реконструкция филогении десяти видов божьих коровок	64
3.2. Исследование изменчивости нуклеотидных последовательностей участка митохондриального гена цитохромоксидазы I внутри вида <i>Adalia bipunctata</i>	69
3.3. Сравнительный анализ полиморфизма длин внутренних транскрибируемых спейсеров рДНК кокцинеллид	74
4. ВЫВОДЫ	79
5. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	80
6. ПРИЛОЖЕНИЕ	91

ВВЕДЕНИЕ

Интерес к проблеме происхождения, филогенетических взаимоотношений, видового состава жуков семейства Coccinellidae обусловлен их значительным фенотипическим разнообразием и высокой географической изменчивостью. Многие виды божьих коровок проявляют полиморфизм по окраске и рисунку на надкрыльях и переднеспинке, и существуют многочисленные данные о зависимости структуры популяций этих видов от экологических условий обитания. В то же время систематика, основанная на сравнении морфологических признаков, для многих видов кокцинеллид затруднена (Добржанский, 1924).

Нет единой точки зрения на таксономический статус видов и географических форм рода *Adalia* (Лусис, 1973), в частности, формы *Adalia bipunctata fasciatopunctata* Fald., которая обитает совместно с *Adalia bipunctata bipunctata* в западной части Забайкалья, Туве и Монголии. В Туве доля божьих коровок с фенотипом *fasciatopunctata* составляет 50%-57%, в Монголии-до 75%. В ряде работ эта форма рассматривается как самостоятельный вид (Савойская, 1983; Bielawski R., 1975; Шарова, 1962), в других как подвид или географическая раса (морфа) (Кузнецов, 1993; Лусис, 1973). До настоящего времени не была изучена возможность использования молекулярно-генетических методов в исследовании центрально-азиатских адалий, отличающихся от европейских окраской надкрылий и переднеспинки.

Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей в последнее время приобретает все большее распространение и признание в качестве метода для уточнения статуса групп, положение и родство которых трудно установить на основании морфологических данных. Наиболее часто в целях молекулярной систематики видов насекомых исследуются области рибосомного кластера (NTS, ITS1, ITS2), митохондриальные гены, эволюционирующие с высокой скоростью.

Использование в качестве эволюционного маркера мтДНК позволяет количественно оценить степень генетической разобщенности между родственными видами при изучении нуклеотидных последовательностей. Вместе с тем, на вопрос, какая степень различий между популяциями соответствует их принадлежности к одному виду, а какая – к разным видам, филогенетический анализ не всегда может дать ответ. В этом случае филогенетический анализ должен быть дополнен сравнительной генетикой вида (Алтухов, 2003). Целесообразно в первую очередь определить степень дивергенции мтДНК между видами семейства Coccinellidae, а также в пределах рода *Adalia*. При этом различия между видами в пределах рода должны быть соизмеримы с различиями между популяциями в пределах вида (Алтухов, 2003). Кроме того, определение генетических дистанций между видами и построение филогенетических деревьев, к сожалению, не позволяет определить конкретные механизмы, лежащие в основе эволюционного процесса. В рамках диссертационной работы нами была сделана попытка проведения такого исследования на основе анализа эволюционной изменчивости кластера рибосомных генов.

Цель настоящей работы состояла в изучении филогенетических связей внутри семейства Coccinellidae на основе использования участка митохондриального гена (310 пар нуклеотидов), кодирующего субъединицу I цитохромоксидазы, в частности, сравнение тувинских божьих коровок *Adalia bipunctata fasciatopunctata* и европейских коровок *Adalia bipunctata bipunctata* на молекулярно-генетическом уровне. Перед нами стояли следующие задачи:

- 1) амплификация, клонирование и секвенирование фрагмента гена, кодирующего субъединицу I цитохромоксидазы десяти видов (7 родов) кокциnellид, с целью получения информации о степени variability исследуемого участка мтДНК;

2) проведение филогенетического анализа для определения генетических дистанций между видами семейства Coccinellidae: *Harmonia axyridis* Pall., *Adalia bipunctata* L., *Adalia decempunctata* L., *Coccinella quinquepunctata* L., *Coccinella transversoguttata* Fald., *Coccinella septempunctata* L., *Semiadalia notata* Laich., *Hippodamia tredecimpunctata* L., *Exochomus quadripustulatus* L., *Thea vigintiduopunctata* L.;

3) амплификация, клонирование и секвенирование фрагмента гена, кодирующего субъединицу I цитохромоксидазы *Adalia bipunctata*, с целью получения информации о степени внутривидовой вариабельности исследуемого участка мтДНК;

4) анализ эволюционной изменчивости рДНК, включающей ITS1, 5,8S и ITS2, у нескольких видов кокцинеллид.

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Объект исследований.

1.1.1. Краткая характеристика семейства Coccinellidae.

Божьи коровки – это, как правило, ярко окрашенные жуки, ведущие дневной образ жизни и встречающиеся практически повсеместно. В мировой фауне известно свыше 4000 видов, наиболее богаты тропики. Размеры тела божьих коровок варьируют от 1,5 мм до 10 мм в длину. Божьи коровки относятся к группе Endopterygota (Кузнецов, 1993). Они проходят полный жизненный цикл, состоящий из яйца, личинки, куколки и имаго. Имаго и личинки живут на растениях, большинство из них – хищники. Семейство Coccinellidae делится на две большие группы: хищные и нехищные. Это деление лежит в основе систематики божьих коровок, и выделения растительноядных в отдельное подсемейство Epilachninae (рис. 1) (Majerus, 1994).

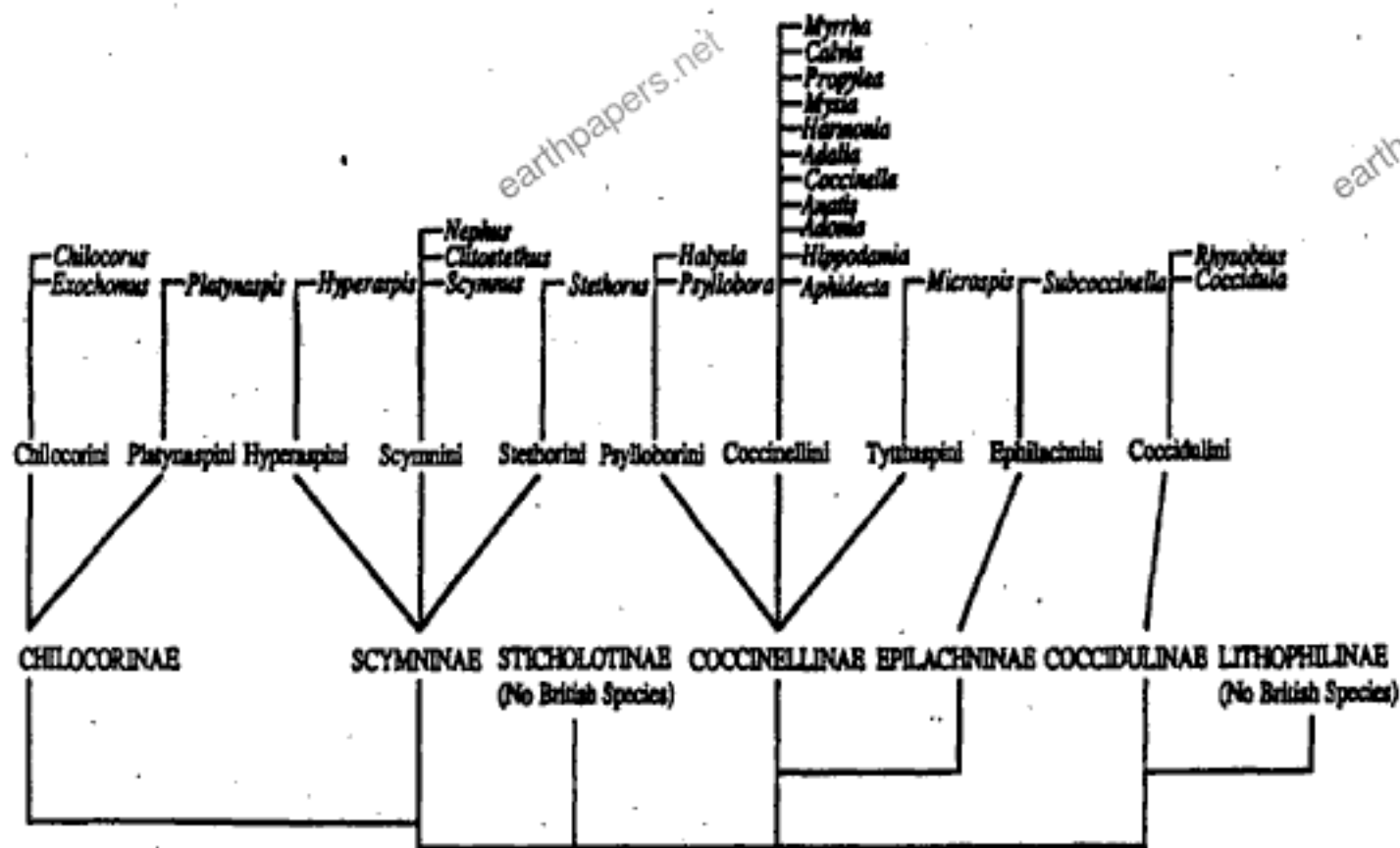


Рисунок 1. Схема филогенетических связей в семействе Coccinellidae (Majerus, 1994)

Предполагается, что фитофагия - это наиболее древний эволюционный признак (Majerus, 1994). Большинство видов божьих коровок являются хищными. Коровки подсемейства *Chilocorinae* питаются кокцидами. Основным источником питания для большинства жуков из других подсемейств составляют тли. Божьи коровки подсемейства *Coccinellinae* - афидофаги, за исключением трибы *Psylloborini*, виды которой являются мицетофагами (Hodek, 1973; Majerus, 1994). Признаки строения ротового аппарата мицетофагов имеют сходство с особенностями строения ротового аппарата как афидофагов, так и фитофагов. Ходек (Hodek, 1973) считает, что присутствие зубов на режущем крае мандибул мицетофагов является в эволюции вторично приобретенным признаком.

Большинство видов божьих коровок отличается яркой окраской. Наиболее многочисленным по числу видов и их форм является подсемейство *Coccinellinae*. К нему относятся наиболее полиморфные виды, у которых окраска и рисунок переднеспинки и надкрылий варьируют, причем вариации рисунка определяются различной комбинацией точек или пятен, которые могут сливаться, образуя более крупные пятна или полосы. Многие виды подсемейства *Coccinellinae*, например, виды рода *Coccinella*, *Adalia*, *Adonia*, *Hippodamia*, *Semiadalia*, характеризуются внутривидовой дифференциацией на формы и географические расы (Dobzhansky, 1933).

Полиморфные виды в большинстве случаев дифференцируются на географические расы в связи с тем, что популяции в определенной части ареала могут отличаться фенотипически от популяций того же вида, обитающих в другой части ареала. Степень дифференциации географических рас варьирует очень сильно у разных видов. У одних видов, например, у *Adonia variegata* Goez., географические расы слабо намечены (Dobzhansky, 1933). Это означает, что в сильно отдаленных популяциях присутствует набор различающихся по окраске

форм жуков с преобладанием одной или нескольких форм. У других видов божьих коровок (*Hippodamia tredecimpunctata* L.) расы четко определяются. У *Hippodamia tredecimpunctata* известны две формы - *signata* и *turica*, которые обитают аллопатрически и не пересекаются. Полиморфные виды характеризуются общей тенденцией к внутривидовой дифференциации на северные пигментированные формы и южные слабопигментированные, причем у некоторых видов наблюдаются промежуточные градации.

Изучение видообразования у кокцинеллид мы начали с исследования вида, у которого географические расы слабо дифференцированы. Таким образом, в задачи диссертационной работы входило не только различение подвидов у *Adalia bipunctata* L., но и определение степени генетической изменчивости между географически удаленными популяциями *Adalia bipunctata* L., различающимися по фенотипу. Полученные данные могут быть использованы для дальнейшего исследования дивергенции видов кокцинеллид рода *Adalia*, а так же других родов.

1.1.2. Полиморфизм вида *Adalia bipunctata*.

Географическое распространение политипического вида *Adalia bipunctata* (L.) охватывает почти всю Палеарктику (также Неарктику). В систематическом плане *A. bipunctata* четко отличается от таких видов, как *A. conglomerata* (L.), *A. decempunctata* (L.) и *A. tetraspilota* Норе (Лусис, 1973). Для этих "настоящих" видов характерны биологические изолирующие механизмы, которые позволяют им там, где они живут совместно существовать без обмена генами, сохранять свои генофонды. Ареал распространения *Adalia decempunctata* (L.) включает только Европу (до лесной зоны включительно), Северную Африку, Крым, Кавказ, Малую и

Переднюю Азию (включая Иран), Западную Сибирь до Томской области и, возможно, Северный Казахстан.

Виды *A. bipunctata* и *A. decempunctata* являются полиморфными по фенотипу. Высокая изменчивость окраски элитр и переднеспинки у *A. bipunctata* (L) и *A. decempunctata* обуславливается в своей основе внутренними наследственными факторами (Лусис, 1973). Я.Я. Лусис изучал кокцинеллид более пятидесяти лет. В своих работах по изучению наследования окраски и рисунка он показал, что все изученные варианты окраски и рисунка надкрылий у адалий определяются аллелями одного гена ($S^l - S^m - S^p - S^i - S^t - S^s - S^a - S^d$). Рисунок переднеспинки наследуется сцепленно с рисунком элитр.

Вид *A. bipunctata* занимает обширный ареал, в пределах которого популяции могут существенно различаться. Локальные популяции *A. bipunctata* состоят чаще всего из жуков, относящихся к разным морфам. У *A. bipunctata* в европейских популяциях преобладает морфа *f. bipunctata*, но наряду с ней в популяциях встречаются также черные доминантные формы, из которых наиболее часты *quadrinaculata* и *sexpustulata*.

Изучение географической изменчивости у двухточечной божьей коровки было начато Ф.Т. Добржанским (1924). Он отметил значительно большую вариабельность азиатских коровок в сравнении с европейскими. Во всех природных популяциях *A. bipunctata* сосуществуют несколько резко различающихся по окраске надкрылий и пронотума форм. Изменчивость географически удаленных популяций проявляется также в изменении соотношения разных форм в популяциях. Географическую изменчивость адалий изучал Я.Я. Лусис. Им показано, что популяции *A. bipunctata* Закавказья (Армении), Средней Азии и Монголии отличаются друг от друга присутствием в них специфических фенотипов, которые не встречаются в других регионах, наряду