

© И. А. Захаров^{1,2},
Е. В. Шайкевич¹

¹ Институт общей генетики
им. Н. И. Вавилова РАН,
Москва;

² Московский Государственный
Университет им. М. В. Ломоно-
сова, каф. генетики, Москва

✿ Изучен полиморфизм мтДНК по гену *COI* в популяции двуточечной божьей коровки *Adalia bipunctata* Санкт Петербурга и зараженность жуков симбиотической бактерией *Spiroplasma*. Обнаружено 13 митотипов, различающихся последовательностью нуклеотидов в средней части гена *COI*. Из проверенных 84 жуков 21 заражен *Spiroplasma*. Среднее попарное различие нуклеотидов последовательностей *COI* среди зараженных жуков 0,001, среди незараженных 0,020, таким образом полиморфизм мтДНК значительно выше среди незараженных, чем среди зараженных жуков.

✿ **Ключевые слова:** двуточечная божья коровка; *Adalia bipunctata*; состав популяции; митохондриальная ДНК; *Spiroplasma*.

ПОЛИМОРФИЗМ мтДНК В ПЕТЕРБУРГСКОЙ ПОПУЛЯЦИИ *ADALIA BIPUNCTATA* И ЕГО СВЯЗЬ С ЗАРАЖЕННОСТЬЮ СИМБИОТИЧЕСКОЙ БАКТЕРИЕЙ *SPIROPLASMA*

ВВЕДЕНИЕ

Двуточечная божья коровка *Adalia bipunctata* L. (Coleoptera: Coccinellidae) является удобным объектом для разработки проблем экологической и популяционной генетики (обзоры — Majerus, 1994; Захаров, 1995). В проведенных на этом объекте исследованиях обычно учитывается полиморфизм по одному гену, определяющему окраску и характер рисунка на надкрыльях. Полиморфизм по молекулярным маркерам (митохондриальная ДНК) почти не изучался, он был описан только в одной работе (Schulenburg et al., 2002). Среди популяций *A. bipunctata* петербургская, которая явилась объектом настоящего исследования, выделяется очень высоким содержанием форм-меланистов (Лусис, 1961; Сергиевский, Захаров, 1983; Захаров, 2009). Также было показано, что в этой популяции большой процент жуков заражен цитоплазматической бактерией *Spiroplasma* (Захаров и др., 1998, 2000). Эта популяция обитает в северной части ареала вида и имеет возраст всего лишь около 300 лет (считая с момента основания Санкт-Петербурга). Поскольку размножение адалий в городе происходит главным образом на растениях-интродуцентах (липа, карагана, дерн) численность жуков в Санкт-Петербурге намного превосходит их численность в естественных биотопах Ленинградской области. Все сказанное позволяло ожидать своеобразие генетической структуры этой популяции.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Использованные в настоящей работе жуки *Adalia bipunctata* L. (Coleoptera: Coccinellidae) были собраны на стадии имаго в июне 2009 г. на кустах караганы, растущих на Университетской наб., вдоль зданий Санкт-Петербургского Университета. Выборка была представлена перезимовавшими жуками, т. е. собравшимися в место сбора из разных колоний, где происходило их размножение. Состав изученной популяции по признаку окраски надкрылий описан в работе И. А. Захарова (2009).

Для выделения ДНК из живых жуков использовали набор D1Atom™ DNA Prep (Изоген, Москва). В реакции амплификации использовали по 0,1 мкг выделенной ДНК. Полимеразную цепную реакцию проводили на термоциклере GeneAmpR PCR System 2700 (Applied Biosystems, USA), применяя наборы для амплификации GenePak™ PCR Core (Изоген, Москва), придерживаясь инструкции производителя. Набор состоит из готовых Мастермиксов и PCR Diluenta. Конечные концентрации компонентов реакционной смеси были: Трис-НСl, рН 8,8, 67mM; (NH₄)₂SO₄ 16mM; MgCl₂ 2,5 mM; dNTP 200μM каждого и одна единица Taq ДНК-полимеразы.

Шуленбург и др. (Schulenburg et al., 2002) показали, что в митохондриальном геноме адалии один из наиболее изменчивых районов — средняя область гена *COI*. В настоящей работе для амплификации этой области в полимеразной цепной реакции (ПЦР) были использованы рекомендованные в вышеупомянутой работе праймеры:

C1-j-1951-(5'-ТТСАТСААТТТТАГГАГСТГ-3') и
C1-N-2618-(5'-ТГСТАТААТАГСАААТАСАГ-3').

Поступила в редакцию 10.06.2010.
Принята к публикации 27.10.2010.

Были получены амплифицированные продукты размером 700 п. н. Условия ПЦР: первичная денатурация — 5 мин при 94 °С; 35 циклов: денатурация при 94 °С — 30 сек, отжиг при 55 °С — 40 сек, синтез при 72 °С — 40 сек; завершающий синтез при 72 °С — 10 мин.

Определение зараженности жуков симбиотической бактерией *Spiroplasma* проводили с помощью ПЦР со специфическими к гену малой субъединицы 16S РНК бактерии праймерами:

MGSO-(5'-TGCACCATCTGTCACTCTGTTAACCTC-3')
и FP-(5'-GCTCAACCCCTAACCGCC-3')

(Kuppeveld et al., 1992).

Условия проведения ПЦР: первичная денатурация — 5 мин при 94 °С; 35 циклов: денатурация при 95 °С — 35 сек, отжиг при 55 °С — 1 мин, синтез при 72 °С — 1 мин; завершающий синтез при 72 °С — 10 мин. Размер специфичного для ДНК *Spiroplasma* ПЦР-продукта составлял 429 п. н.

Ампликоны выявляли путем электрофореза в 1 %-м агарозном геле (Sigma, США). Амплифицированные фрагменты ДНК гена *COI* выделяли из геля с использованием набора JETQUICK Gel Extraction Spin Kit (Genomed, Germany) для последующего секвенирования. Секвенирование проводили на приборе ABI PRISM 310 с использованием реагентов фирмы "Applied Biosystems", США, по инструкции производителя. Последовательности, полученные в результате секвенирования продуктов амплификации *COI* гена, были зарегистрированы в GenBank под номерами: HM150667-HM150700.

Сопоставление нуклеотидных последовательностей выполняли с использованием программ ChromasPro и MEGA version 4.0 (Tamura et al., 2007) с помощью последней программы строили приведенное ниже филогенетическое дерево.

Описанные в работе (Schulenburg et al., 2002) и использованные нами для сравнения нуклеотидные последовательности центральной области гена *COI* были взяты из GenBank (AJ313060-AJ313070).

РЕЗУЛЬТАТЫ

По составу митотипов петербургская популяция *Adalia bipunctata* оказалась высоко полиморфной (рис. 1), в ней обнаружено 6 из 10 ранее описанных митотипов (отсутствуют № 5, 6, 7, 8). Кроме того, нами найдены новые, которые были обозначены 11, 12, 13, 14, 15, 16 и 17 (рис. 1). Все новые митотипы, кроме 13, отличаются от ранее обнаруженных одной нуклеотидной заменой. Митотип № 13 отличается от третьего тремя нуклеотидными заменами. Всего, таким образом, в проанализированной выборке из 34 особей было обнаружено 13 митотипов, из которых численно преобладает тип 1 (18 особей).

Среди изученных 84 жуков 21 оказался зараженным спироплазмой (что соответствует ранее полученным данным (Захаров и др., 1998, 2000). При анализе жуки не были разделены по полу; если самки составляют около 50 % выборки, то среди них доля зараженных оказывается равной около 50 % (самцы зараженными быть не могут, спироплазма является андроцидным агентом).

Как показывают данные, представленные на рис. 1 и 2, среди зараженных особей преобладает митотип 1 (11 жуков); встречаются также митотипы 2, 3, 11, 17, которые отличаются от первого только одной заменой нуклеотидов (рис. 1). В то же время среди незараженных спироплазмой встречено 10 митотипов, 9 из которых отличаются от типа 1 по 1–4, 24 и 34 нуклеотидам.

ОБСУЖДЕНИЕ

Хотя петербургская популяция располагается близко к северной границе ареала вида *Adalia bipunctata*, и можно было бы ожидать в ней низкий уровень полиморфизма как эффект бутылочного горлышка при основании этой популяции, она оказалась по мтДНК высоко полиморфной (13 митотипов). Для сравнения можно привести данные из работы (Schulenburg et al., 2002) по популяциям Билефельд-Германия и Москва, соответственно: 7 митотипов среди 16 особей и 8 среди 22. Подобных данных для других популяций нет.

Особый интерес представляют митотипы 9 и 10. По данным Шуленбурга и др. (Schulenburg et al., 2002) они встречаются в Великобритании (митотип 9), Германии (оба), Петербурге (оба), Москве (оба). При этом жуки митотипа 10 всегда заражены риккетсией, митотипа 9 — либо также содержат риккетсию, либо свободны от инфекции. В настоящей работе мы не учитывали зараженность риккетсией. Происхождение сильно отличающихся от всех остальных митотипов 9 и 10 заслуживает специального изучения.

Проведенное нами исследование позволяет рассмотреть влияние зараженности симбиотической бактерией на полиморфизм по мтДНК. Известно, что и симбиотические бактерии (*Spiroplasma*, *Wolbachia*), и мтДНК передаются строго по материнской линии, т. е. проявляют, формально говоря, «неравновесие по сцеплению». Как было отмечено в работе Шуленбурга и др. (Schulenburg et al., 2002) среди зараженных жуков преобладает один митотип — в случае спироплазмы № 1. Это наблюдение мы подтвердили и дополнили. Оказалось, что среди зараженных жуков резко снижен уровень полиморфизма мтДНК — были определены средние нуклеотидные различия между жуками в двух выборках — зараженных и незараженных. Для первой эта величина оказалась равной 0,001, для второй 0,020. Подобный эффект присутствия симбиотических бактерий был описан нами для популяций комаров (Шай-

	11111111	1112223333	3333333333	4444444455	55555]		Митотип
[1122367788	9912455666	7791890012	3346677889	1233389901	234444]	
[3623340358	1467547069	2504081468	4891769587	2403616984	02147]	
#SP8	TGTCCATAAA	ATTTACTTAG	TACAGACATT	TCTTATACCA	GТАААТТТАС	GATGG	1
#SP9+C.	3
#SP10+G.	2
#SP11G.....	4
#SP12	.ACT...TG	G.C....GA	..T.AG.G..	CT.....G	AC.TTC....	..CAA	9
#SP13+	1
#SP14	AT.T...T..	GCCCGTC...	C..GA.T..C	.TCCGCGTT.	A.GGTCCCCT	...T	10
#SP15	1
#SP16	1
#SP17	AT.T...T..	GCCCGTC...	C..GA.T..C	.TCCGCGTT.	A.GGTCCCCT	...T	10
#SP18	1
#SP19G.....C.	12
#SP20	1
#SP21+	1
#SP22+G..	11
#SP23G..	11
#SP25	1
#SP26	...T.....G..	...A...C.	13
#SP27A...	14
#SP28G....G..G...	15
#SP29C.	3
#SP30C.	3
#SP32C.T	16
#SP33	1
#SP35+	1
#SP37+	1
#SP40+	1
#SP43+	1
#SP44+G...	17
#SP49+	1
#SP62+	1
#SP65+	1
#SP68+	1
#SP79+	1
#AJ313070type1	1
#AJ313061type2G.	2
#AJ313062type3C.	3
#AJ313063type4G....	4
#AJ313064type5G....	5
#AJ313065type6C.	A...T	6
#AJ313066type7A...	7
#AJ313060type8T..C.G	8
#AJ313067type9	.ACT...TG	G.C....GA	..T.AG.G..	CT.....G	AC.TTC....	..CAA	9
#AJ313068type10	AT.T...T..	GCCCGTC...	C..GA.T..C	.TCCGCGTT.	A.GGTCCCCT	...T	10

Рис. 1. Сравнение переменных нуклеотидных сайтов средней области гена *COI Adalia bipunctata* из Санкт-Петербурга (SP) и ранее обнаруженных митотипов (GenBank: AJ313060-AJ313070). Плюсиком обозначены особи, зараженные *Spiroplasma*

кевич и др., 2005) и другими авторами для ряда видов насекомых (Turelli et al., 1992; Jiggins, 2003 и др.). Эти наблюдения могут быть объяснены тем, что симбиотические бактерии передаются вертикально в ряду поколений, а горизонтальная их передача происходит крайне редко. При таком исключительном событии — заражении особи *de novo* возникает линия, в которой с материнской стороны передаются внедрившаяся бактерия и определенный тип мтДНК. Вероятно, во многих случаях

присутствие симбиотической бактерии придает насекомому какие-то значительные преимущества и зараженные линии, несмотря на редкость их возникновения, успешно распространяются в популяциях, что обеспечивает и распространение «сцепленного» с бактерией митотипа. Этот эффект, неоднократно описанный для *Wolbachia*, как показали результаты настоящей работы, точно также имеет место и при распространении *Spiroplasma*.

Литература

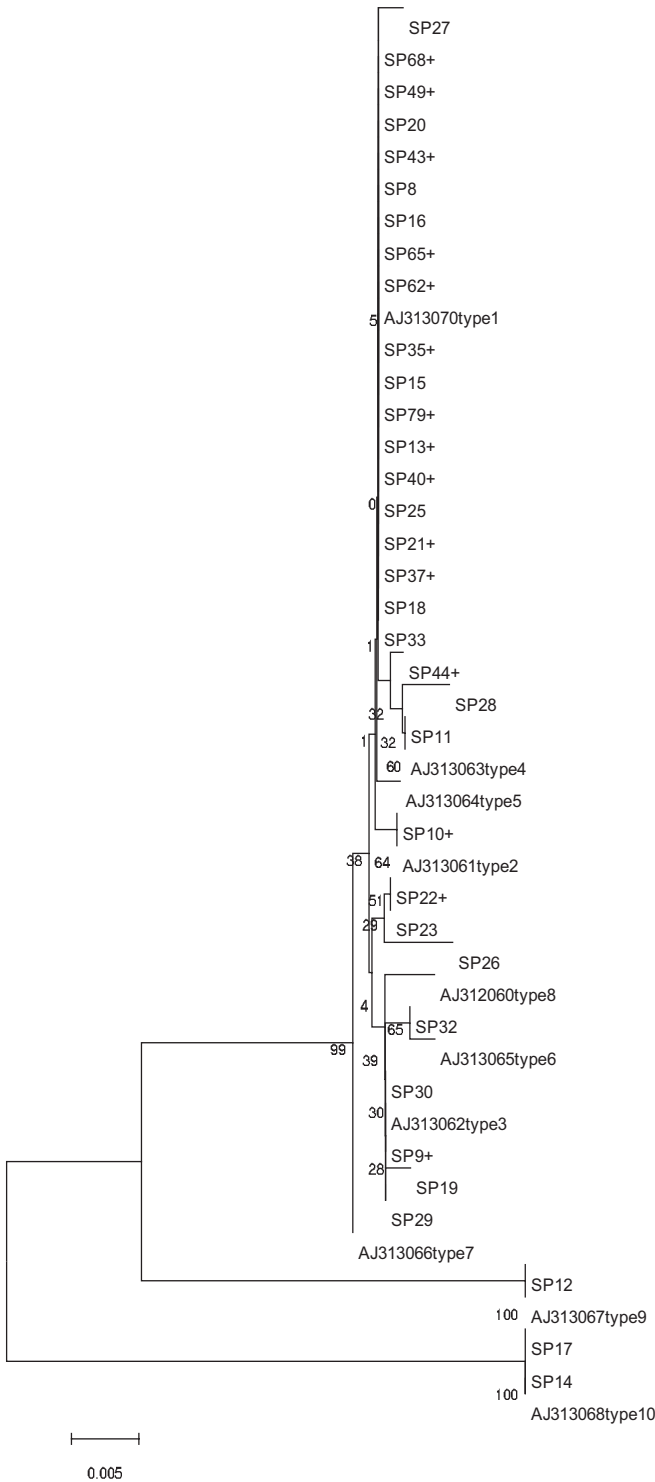


Рис. 2. Дендрограмма сходства последовательностей нуклеотидов гена *COI A. bipunctata*, построенная с использованием метода Neighbor-Joining (NJ). Плюсом обозначены особи, зараженные *Spiroplasma*. Цифрами указаны бутстреп-коэффициенты, рассчитанные для 1000 повторов

1. Захаров И. А., 2009. Динамика генофонда петербургской популяции *Adalia bipunctata* за 75 лет наблюдений // Экологическая генетика. Т. 7. № 4. С. 57–59.
2. Захаров И. А., Шайкевич Е. В., Горячева И. И. Бактерии рода *Spiroplasma* инфицируют двуточечную божью коровку (*Adalia bipunctata* L.) в России // ДАН. 1998. Т. 362. № 4. С. 570–573.
3. Захаров И. А., Горячева И. И., Шайкевич Е. В., Доржу Ч. М., 2000. Распространение в популяциях *Adalia bipunctata* L. Евразии цитоплазматически наследуемой бактерии рода *Spiroplasma*, влияющей на соотношение полов // Генетика. Т. 36. № 2. С. 191–194.
4. Лусис Я. Я., 1961. О биологическом значении полиморфизма окраски у двуточечной коровки *Adalia bipunctata* L. // Latvijas Entomologs. № 4. С. 3–29.
5. Сергеевский С. О., Захаров И. А. 1983. Изучение генетического полиморфизма популяций двуточечной божьей коровки *Adalia bipunctata* (L.) Ленинградской области. 2. Состав популяций города Ленинграда // Генетика. Т. 19. С. 635–640.
6. Шайкевич Е. В., Виноградова Е. Б., Платонов А. Е., и др., 2005. Полиморфизм митохондриальной ДНК и зараженность цитоплазматической симбиотической бактерией *Wolbachia pipiens* комаров комплекса *Culex pipiens* (Diptera, Culicidae) из России // Генетика. Т. 41. № 3. С. 320–325.
7. Jiggins F. M., 2003. Male-killing *Wolbachia* and mitochondrial DNA: selective sweeps, hybrid introgression and parasite population dynamics // Genetics. Vol. 164. P. 5–12.
8. Schulenburg J. H., Hurst G. D., Tetzlaff D. et al., 2002. History of infection with different male-killing bacteria in the two-spot ladybird beetle *Adalia bipunctata* revealed through mitochondrial DNA sequence analysis // Genetics. Vol. 160. P. 1075–1086.
9. Tamura K., Dudley J., Nei M., Kumar S., 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4. 0. Molecular Biology and Evolution. Vol. 24. P. 1596–1599. (Publication PDF at <http://www.kumarlab.net/publications>).
10. Turelli M., Hoffmann A. A., McKechnie S. W. 1992. Dynamics of cytoplasmic incompatibility and mtDNA variation in natural *Drosophila simulans* populations // Genetics. Vol. 132. P. 713–723.
11. Van Kuppeveld F. J. M., Van der Logt H. T. M., Angulo A. F. et al., 1992. Genus- and species-specific identification of mycoplasmas by 16S rRNA amplification // Appl. Environ. Microbiol. Vol. 58. P. 2606–2615.
12. Zakharov I. A., Shaikevich E. V., 2001. The Stockholm populations of *Adalia bipunctata* (L.) (Coleoptera: Coccinellidae) — a case of extreme female-biased population sex ratio // Hereditas. Vol. 134. P. 263–266.

**POLYMORPHISM OF mtDNA IN ST PETERSBURG
POPULATION OF *ADALIA BIPUNCTATA* AND ITS RELATION
WITH INFECTION BY SYMBIOTIC BACTERIUM
*SPIROPLASMA***

Zakharov I. A., Shaikevich E. V.

✿ **SUMMARY:** Polymorphism of the mtDNA gene *COI* was studied in a St. Petersburg population of two spot ladybird *Adalia bipunctata* and analyzed in relation with the presence of a symbiotic bacterium *Spiroplasma*. Variable nucleotide sequences in the middle part of the gene *COI* formed 13 mitotypes. 84 ladybirds were studied, 21 of these were found to be infected by *Spiroplasma*. Mean pairwise difference of nucleotides in the *COI* sequence was 0.001 for uninfected and 0.020 for infected individuals, thus mtDNA polymorphism was considerably higher among uninfected ladybirds compared with infected ones.

✿ **KEY WORDS:** two spot ladybird; *Adalia bipunctata*; population composition; mitochondrial DNA; *Spiroplasma*.

✿ Информация об авторах

Захаров Илья Артемьевич — член-корр. РАН, советник РАН.
Институт общей генетики им. Н. И. Вавилова РАН.
119991 Москва, ул. Губкина 3.
E-mail: iaz34@mail.ru.

Шайкевич Елена Владимировна — с. н. с.
Институт общей генетики им. Н. И. Вавилова РАН.
119991 Москва, ул. Губкина 3.
E-mail: elenashaikevich@mail.ru.

Zakharov Ilya Artemjevich — corresponding member RAS.
Vavilov Insitute of General Genetics RAS.
119991 Moscow, Gubkin Str. 3.
E-mail: iaz34@mail.ru.

Shaikevich Elena Vladimirovna — Senior research scientist.
Vavilov Insitute of General Genetics RAS.
119991 Moscow, Gubkin Str. 3.
E-mail: elenashaikevich@mail.ru.