

УДК 575.86 : 595.763.79

© М. В. Паленко, Е. В. Шайкевич,
Д. В. Муха и И. А. ЗахаровМОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К ФИЛОГЕНИИ
ЖУКОВ СЕМЕЙСТВА БОЖЬИХ КОРОВОК (COLEOPTERA,
COCCINELLIDAE)[M. V. PALENKO, E. V. SHAIKEVICH, D. V. MUKHA a. I. A. ZAKHAROV.
A MOLECULAR-GENETIC APPROACH TO THE COCCINELLID PHYLOGENY (COLEOPTERA,
COCCINELLIDAE)]

Божьи коровки — это, как правило, яркоокрашенные жуки, ведущие дневной образ жизни и встречающиеся практически повсеместно (Кузнецов, 1993).

Сем. Coccinellidae делится на 2 большие биологические группы: хищные и нехищные. Большинство видов божьих коровок являются хищными. Подсем. Epilachninae характеризуется растительноядностью (Hodek, 1973; Кузнецов, 1993; Majerus, 1994). Предполагается, что фитофагия — это наиболее древний эволюционный признак (Majerus, 1994). Коровки подсем. Chilocerinae питаются кокцидами. Основной источник питания для большинства жуков из других подсемейств составляют тли. Божьи коровки подсем. Coccinellinae — афидофаги, за исключением видов трибы Psylloborini, которые являются мицетофагами (Hodek, 1973; Majerus, 1994). Признаки строения ротового аппарата мицетофагов имеют сходство с признаками такового как афидофагов, так и фитофагов. Ходек (Hodek, 1973) считает, что присутствие зубцов на режущем крае мандибул мицетофагов является в эволюции вторично приобретенным признаком.

Из ряда подсемейств сем. Coccinellidae (Epilachninae, Lithophilinae и Coccinellinae) подсем. Coccinellinae самое крупное и включает значительное число триб. В задачу настоящей работы входило рассмотрение изменчивости на молекулярном уровне некоторых структур генома кокциnellид в связи с их эволюцией. Для этого было использовано 2 подхода. Один заключался в сравнительном анализе нуклеотидных последовательностей мтДНК (фрагмента гена субъединицы цитохромоксидазы I) — методе, успешно используемом для определения генетических дистанций между таксонами насекомых и воссоздания их эволюционной истории (Simon et al., 1994). При другом подходе сравнивалась длина нуклеотидных последовательностей части рибосомного кластера (ITS1, 5.8S, ITS2). Оба метода могут быть использованы для идентификации видов божьих коровок и в совокупности дать дополнительную информацию об эволюционных связях таксонов, в частности мицетофагов и афидофагов сем. Coccinellidae.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

В работе были изучены следующие виды божьих коровок: *Adalia bipunctata* L. (место сбора — Москва), *A. decempunctata* (Москва), *Coccinella quinquepunctata* L. (Москва), *Harmonia axyridis* Pall. (информация взята из базы данных GenBank), *Hippodamia tredecimpunctata* L. (Санкт-Петербург), *Semiadalia notata* Laich. (Москва), *Propylea quatuordecimpunctata* (Москва), *Thea vigintiduopunctata* L. (Киргизия), *Exochomus quadripustulatus* L. (Крым, Гурзуф), *Chilocorus renipustulatus* (Москва). Выделение тотальной ДНК проводили, согласно ранее опубликованной методике, с обработкой лизата протеиназой К и последующей экстракцией ДНК смесью фенол—хлороформ (Маниатис, 1984).

Для амплификации участка митохондриального гена цитохромоксидазы I размером 310 п. н. и его секвенирования были использованы праймеры, специфичные к 3'-концу гена, UEA9 и UEA10 (Juan et al., 1996). Реакция амплификации состояла из 35 циклов и проходила в режиме 30 с при 94°, 1 мин при 50°, 1 мин при 72°. Для амплификации фрагмента рДНК, включающего ITS1, 5.8S, ITS2, использовались ранее описанные универсальные праймеры DAMS18 и DAMS28 (Муха, Сидоренко, 1995; Муха, Сидоренко, 1996). Реакцию проводили по следующей программе: 5 мин при 95°, 1 мин при 94°, 2 мин при 55°, 3 мин при 72° — 30 циклов, 7 мин при 72°.

Продукты ПЦР после очистки набором реактивов Wizard PCR DNA Purification Systems («Promega», США) были клонированы в векторе pGEM-T Easy Vector («Promega», США). Секвенирование проводили в циклическом режиме на приборе ABI PRISM 310. Последовательность нуклеотидов сравнивали посредством программы CLUSTAL-W (Thompson et al., 1994). Степень изменчивости гена цитохромоксидазы I оценивали с помощью компьютерной программы Mega (Kumar et al., 1993). Филогенетические деревья построены дистантным методом UPGMA с использованием алгоритма Кимуры (Kimura, 1980), а также с оценкой аминокислотной изменчивости и учетом замен в первой и второй позициях кодона. Бутстрэп-анализ проведен на 500 повторностях (Kumar et al., 1993).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В данной работе определена первичная структура 3' области гена COI у 6 видов разных родов семейства Coccinellidae. Степень дивергенции нуклеотидных последовательностей колеблется от 11.8 до 28.6% (см. таблицу). Филогенетические деревья, построенные дистантным методом, дают однозначный результат, свидетельствующий о монофилетическом происхождении подсем. Coccinellinae. С максимальной поддержкой 98% индекса бутстрэпа на дистантном древе (рис. 1, 2) расходятся 2 сестринские группы: триба мицетофагов Psylloborini и триба афидофагов Coccinellini. Их расхождение представляется, однако, гораздо более недавним событием, чем радиация ветви кокцидофагов (подсем. Chilocerinae) от общего предка. При реконструкции филогении за внешнюю группу (корневую) взят вид *Donacia provostii* (GenBank AY232543) из сем. Chrysomelidae. Таким образом, ре-

Генетические дистанции между представителями сем. Coccinellidae при попарном сравнении. Использован метод Кимуры с учетом замен в 3 положениях кодона

Виды	1	2	3	4	5	6	7
1. <i>Adalia bipunctata</i>							
2. <i>Coccinella quinquepunctata</i>	0.155						
3. <i>Harmonia axyridis</i>	0.170	0.190					
4. <i>Semiadalia notata</i>	0.141	0.170	0.180				
5. <i>Hippodamia tredecimpunctata</i>	0.141	0.175	0.179	0.118			
6. <i>Exochomus quadripustulatus</i>	0.242	0.247	0.286	0.247	0.275		
7. <i>Thea vigintiduopunctata</i>	0.189	0.221	0.241	0.226	0.231	0.280	
8. <i>Donacia provostii</i>	0.441	0.433	0.488	0.496	0.515	0.469	0.560

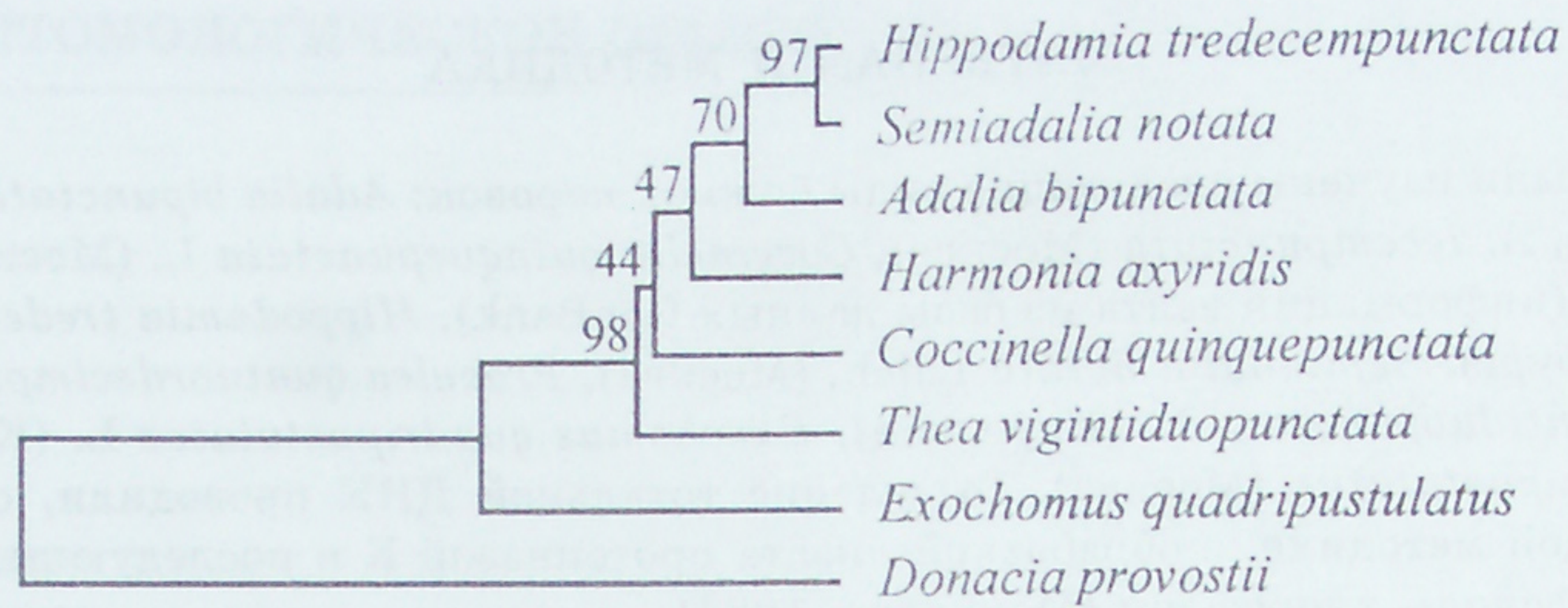


Рис. 1. Филогенетическое древо 7 видов сем. Coccinellidae, построенное методом UPGMA с использованием алгоритма Кимуры, с учетом замен в первом и втором положениях кодона. Бутстрэп-анализ проведен на 500 повторностях. Величины бутстрэп-коэффициентов обозначены в местах разветвлений филогенетического древа.

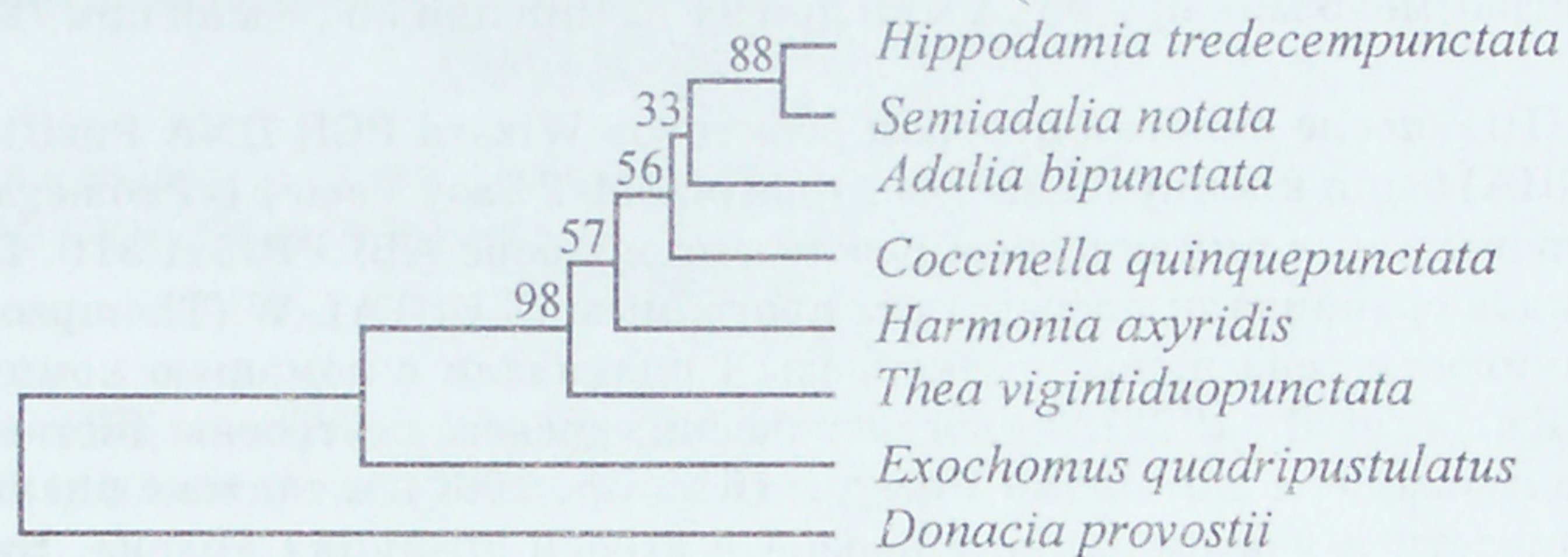


Рис. 2. Филогенетическое древо 7 видов сем. Coccinellidae, построенное методом UPGMA с оценкой числа аминокислотных замен. Бутстрэп-анализ проведен на 500 повторностях. Величины бутстрэп-коэффициентов обозначены в местах разветвлений филогенетического древа.

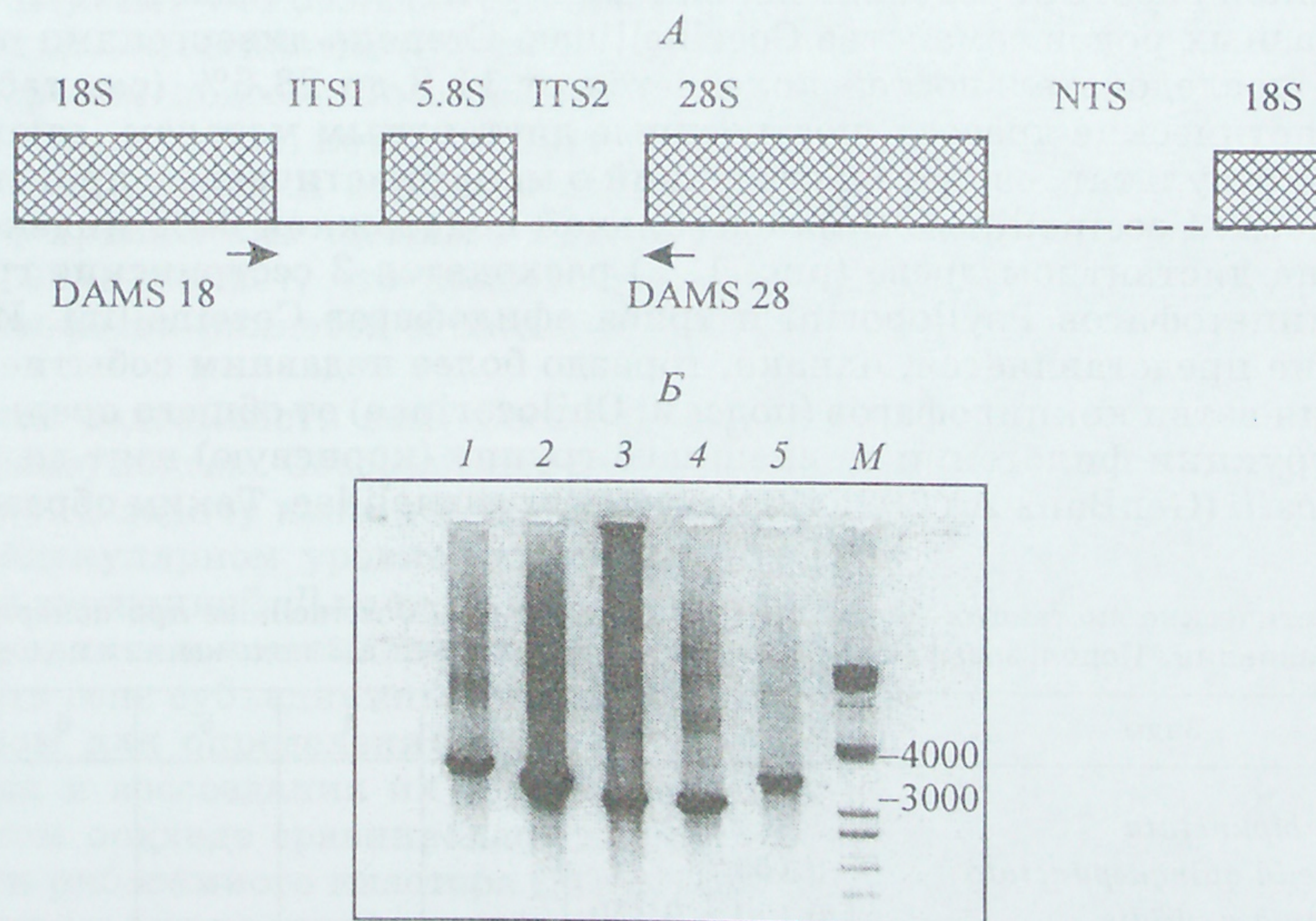


Рис. 3. Схема строения кластера рибосомных генов божьих коровок (А) и электрофорез продуктов ПЦР (область ITS1, 5.8S, ITS2), полученных при амплификации рДНК божьих коровок (Б).

1 — *Adalia bipunctata*, 2 — *Propylea quatuordecimpunctata*, 3 — *Chilocorus renipustulatus*, 4 — *Coccinella quinquepunctata*, 5 — *Adalia decempunctata*, М — маркер, полученный расщеплением ДНК фага лямбда эндонуклеазой PstI (цифрами справа обозначены длины PstI-фрагментов в п. н.).

зультаты анализа нуклеотидных последовательностей гена цитохромоксидазы I подтверждают филогенетическое родство мицетофагов и афидофагов и их удаленность от представителей подсем. Chilocorinae.

Дивергенция нуклеотидных последовательностей в трибе Coccinellini варьирует от 11.8 до 18%. Наиболее сближены в филогенетическом отношении с высоким индексом бутстрэпа (98%) оказались 2 вида — *Hippodamia tredecimpunctata* L. и *Semiadalia notata* Laich., практически не различимые по окраске и обитающие в сходных экологических условиях. Существует совсем немного морфологических признаков, которые различали бы роды *Hippodamia* и *Semiadalia*, входящие в трибу Hippodamiini (Дядечко, 1954).

При сравнении длины фрагментов рДНК, содержащих транскрибируемые спейсеры (ITS1 и ITS2) (рис. 3, А, Б) 5 видов божьих коровок, было показано, что размер исследуемой области не одинаков у разных видов. Вероятно, тенденция увеличения в эволюции рибосомных структур ДНК, характерная для некоторых групп насекомых (полужесткокрылых, равнокрылых и т. д.) (Алешин и др., 1995), наблюдается также и в эволюции божьих коровок. Данный результат согласуется с ранее полученными результатами по генетической изменчивости нуклеотидных последовательностей ITS1 в сем. Coccinellidae (Shulenburg et al., 2001). Скорее всего, увеличение длины рДНК происходило независимо в разных таксонах. На рис. 3, А наибольшая длина изученной области рибосомной ДНК обнаруживается у вида *Adalia bipunctata* (подсем. Coccinellinae), который представляет наиболее позднюю ветвь в эволюции трибы Coccinellini, что согласуется с результатами анализа фрагмента гена цитохромоксидазы I и результатами анализа ITS1 (Shulenburg et al., 2001).

Высокая степень дивергенции рДНК, отмеченная зарубежными авторами между подсемействами Coccinellinae и Chilocorinae (Shulenburg et al., 2001), была также установлена нами в сравнительном анализе участка гена цитохромоксидазы I. Таким образом, результаты нашей работы дополняют результаты филогенетического анализа по рДНК данными филогенетического анализа мтДНК. Поскольку известно, что морфологическая эволюция отдельных таксонов, так же как и эволюция разных молекулярных структур, происходит с неодинаковой скоростью, использование разных маркеров необходимо как для идентификации видов и различения более крупных систематических единиц, так и для построения общей картины их эволюции.

Работа частично выполнена по гранту президента Российской Федерации для поддержки ведущих научных школ РФ (НШ-827.2003.4).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Алешин А. А., Владыченская Н. С., Кедрова О. С., Милютин И. А., Петров Н. Б. Сравнение генов 18S рибосомной РНК в филогении беспозвоночных // Молекулярная биология. 1995. Т. 29, № 6. С. 1408—1440.
- Дядечко Н. Г. Кокциnellиды Украинской ССР. Киев: Изд-во АН УССР, 1954. С. 102—108.
- Кузнецов В. Н. Жуки-кокциnellиды (Coleoptera, Coccinellidae) Дальнего Востока России. Ч. 2. Владивосток: Дальнаука, 1993. 335 с.
- Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984. С. 403—405.
- Муха Д. В., Сидоренко А. П. Выявление и анализ доменов последовательностей 26S рибосомной ДНК *Tetrahymena pyriformis*, различающихся по степени эволюционного консерватизма // Молекулярная биология. 1995. Т. 29. С. 529—537.
- Муха Д. В., Сидоренко А. П. Выявление и анализ доменов последовательностей 17S рибосомальной ДНК *Tetrahymena pyriformis* // Генетика. 1996. Т. 32, № 11. С. 1494—1497.
- Juan C., Oromi P. a. Hewitt G. H. Phylogeny of the genus *Hegeter* (Tenebrionidae, Coleoptera) and its colonization of the Canary Islands deduced from cytochrome oxidase I mitochondrial DNA sequences // Heredity. 1996. Vol. 76. P. 392—403.

- Hodek I. Biology of Coccinellidae. Prague. Academia. 1973. 260 p.
- Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences // J. Mol. Evol. 1980. Vol. 16. P. 111—120.
- Kumar S., Tamura K., Nei M. Molecular evolutionary genetic analysis. Version 1.0. The Pennsylvania State University. 1993. University Park. PA 16802.
- Majerus M. E. N. Ladybirds. London: Harper Collins Publ., 1994. 367 p.
- Shulenbburg J. H., Hancock J. M., Pagnamenta A., Sloggett J. J., Majerus M. E. N., Hurst G. D. D. Extreme length and length variation in the first ribosomal internal transcribed spacer of ladybird beetles (Coleoptera: Coccinellidae) // Mol. Biol. Evol. 2001. Vol. 18, N 4. P. 648—660.
- Simon C., Frati F., Beckenbach A., Crespi B., Liu H., Flook P. Evolution, weighting and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and compilation of concerted polymerase chain reaction primers // Ann. Ent. Soc. Amer. 1994. Vol. 87, N 8. P. 651—701.
- Thompson J. D., Higgins D. G., Gibson T. J. CLUSTAL-W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice // Nucl. Acids Res. 1994. Vol. 22. P. 4673—4680.

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

Поступила 30 XII 2003.

SUMMARY

The intergeneric variation of the 3'-mitochondrial cytochrome oxidase subunit I gene (310 bp) is characterized based on the analysis of seven species of ladybirds (Coleoptera, Coccinellidae). A phylogenetic tree produced as a result of the comparison of nucleotide sequences of the 310 bp fragment of cytochrome oxidase subunit I gene is in good agreement with morphological and ecological differentiation of coccinellids. Size variation of the DNA fragment containing transcribed spacer is revealed in five ladybird species.