

earthpapers.net

earthpapers.net

earthpapers.net

на правах рукописи

Паленко
Мария Владимировна

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ФИЛОГЕНИИ ЖУКОВ СЕМЕЙСТВА
СОСЦИНЕЛЛИДАЕ

earthpapers.net

earthpapers.net

earthpapers.net

Специальность 03.00.15 - генетика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

earthpapers.net

earthpapers.net

earthpapers.net

Москва - 2004 год

**ОБЯЗАТЕЛЬНЫЙ
БЕСПЛАТНЫЙ
ЭКЗЕМПЛЯР**

Работа выполнена в Группе генетической инженерии животных Института общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН

Научный руководитель: доктор биологических наук
Муха Д. В.

Официальные оппоненты: доктор биологических наук
Митрофанов В.Г.

Кандидат биологических наук
Гришаева Т.М.

Ведущая организация: Институт физико-химической биологии им. А.Н.Белозерского
МГУ им. М.В.Ломоносова

Защита состоится "____" _____ 2004 г. в "____" часов на заседании
Диссертационного совета Д 002.214.01 при Институте общей генетики
им. Н.И. Вавилова РАН по адресу: 119991 ГСП-1, Москва, ул. Губкина, д. 3.
Факс: (095)132-89-62.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института общей генетики им. Н.И.
Вавилова РАН.

Автореферат разослан "____" _____ 2004 года.

Ученый секретарь Диссертационного совета,
кандидат биологических наук

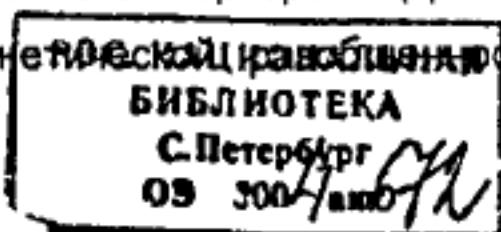
Полухина Г.Н.

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы. 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, 1975; Шарова, 1962], в других как подвид или географическая раса (морфа) [Кузнецов, 1993; Лусис, 1973]. До настоящего времени не была исследована возможность использования молекулярно-генетических методов при изучении 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) и митохондриальные гены, эволюционирующие с высокой скоростью. Использование в качестве эволюционного маркера мтДНК позволяет количественно оценить с т генетической близости д у



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 однозначный ответ. В этом случае филогенетический анализ должен быть дополнен сравнительной генетикой вида [Алтухов, 2003]. В рамках данной работы представлялось целесообразным в первую очередь определить степень дивергенции мтДНК между видами семейства Coccinellidae, а также в пределах рода *Adalia*. Для определения генетических дистанций по исследуемому молекулярно-генетическому маркеру 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.

Цели и задачи исследования. 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.

В задачи входило:

1) Амплификация, клонирование и секвенирование фрагмента гена, кодирующего субъединицу I цитохромоксидазы десяти видов (7 родов) кокциnellид, с целью получения информации о степени вариабельности 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 вариативности исследуемого участка мтДНК.

4) Анализ эволюционной изменчивости рДНК, включающей ITS1, 5.8S и ITS2, у нескольких видов кокциnellид.

Научная новизна и практическая ценность работы. В данной работе проведен сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей участка гена субъединицы I цитохромоксидазы десяти видов божьих коровок (7 родов). Впервые показана возможность использования нуклеотидных последовательностей мтДНК для изучения филогении божьих коровок (Coccinellidae). Охарактеризована изменчивость исследуемой мтДНК, нуклеотидный состав, определены генетические дистанции между десятью видами божьих коровок, построены филогенетические деревья на основе матриц нуклеотидной изменчивости мтДНК и изменчивости аминокислот в белке цитохромоксидазы I. Для трех видов (*Harmonia axyridis*, *Adalia decempunctata*, *Coccinella transversoguttata*) установлены значения дивергенции мтДНК между особями из географически удаленных популяций.

Проведен сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей 3' - области гена, кодирующего субъединицу I цитохромоксидазы у представителей *Adalia bipunctata* L., имеющих различную окраску переднеспинки и надкрылий, из географически удаленных популяций (Тува, Италия). Результаты работы позволяют понять эволюционные процессы видообразования божьих коровок, исследовать микроэволюционные процессы, то есть относительно недавние события дивергенции на межпопуляционном уровне. Полученные сведения могут быть использованы для дальнейшего

изучения филогенетических связей видов кокцинеллид, в том числе подвидов *Adalia bipunctata* L, имеющих спорный таксономический статус.

В работе также проведено сравнение длины участка рДНК, включающего нуклеотидные последовательности ITS1, 5.8S, ITS2. Выявлен генетический мономорфизм исследуемого признака в пределах вида и сальтационный характер изменчивости при сравнении рДНК различных видов семейства Coccinellidae.

Апробация работы. Результаты диссертационной работы доложены на конкурсе молодых ученых, Москва, 2001 г.; конкурсе молодых ученых, Москва, 2003 г.; 2-ой конференции МОГиС "Актуальные проблемы генетики", Москва, 2003 г.; конференции молодых ученых по молекулярной биологии и генетики, Киев, 2003 г.

Структура и объем диссертации. Публикации. Диссертация состоит из шести разделов: введение и обзор литературы, материалы и методы, результаты работы и их обсуждение, выводы, список использованной литературы, приложение. Работа изложена на 91 страницах, иллюстрирована 17 рисунками, и содержит 6 таблиц. Библиография - 97 источников зарубежных и отечественных авторов.

По теме диссертационной работы опубликовано 3 печатных работы.

Работа выполнена в сотрудничестве с лабораторией профессора Захарова И. А. (Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН), при финансовой поддержке программы поддержки научных школ (фант НШ-827.2003.4).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В данной работе были использованы кокцинеллиды разных видов: *Harmonia axyridis* Pall. (1 особь, Сибирь), *Adalia decempunctata* L (1 особь, Болгария), *Coccinella quinquepunctata* L (1 особь, Москва), *Coccinella transversoguttata* Fald. (2 особи, Тува), *Coccinella septempunctata* L. (1 особь, Кавказ), *Semiadalia notata* Laich. (1 особь, Москва), *Hippodamia tredecimpunctata* L. (1 особь, Санкт-Петербург),

Exochomus quadripustulatus L. (1 особь, Крым), *Thea vigintiduopunctata* L. (1 особь, Киргизия).

В популяционный анализ *Adalia bipunctata* были включены девять особей из итальянской популяции, 15 особей *Adalia bipunctata* из Тувы, одна особь из Санкт-Петербурга, одна особь из Болгарии.

Выделение тотальной ДНК из божьих коровок проводили согласно стандартной методике с обработкой лизата протеиназой K и последующей экстракцией ДНК смесью фенол-хлороформ [Маниатис, Фрич, Сзмбрук., 1984].

Фрагменты (310 п.н.) гена субъединицы I цитохромоксидазы исследуемых кокциnellид были амплифицированы с помощью специфичных праймеров UEA9 и UEA10 [Juan, 1996], клонированы в клетках штамма *Escherichia coli* XL2-Blue с помощью векторной плазмиды pGEM®-T Easy Vector ("Promega", США) и секвенированы. Секвенирование проводили ручным и автоматическим способами. Было использовано несколько клонов на каждый вид.

В работе использованы компьютерные базы данных и Internet-ресурсы, размещенные на сервере **NCBI** (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Программу анализа нуклеотидных последовательностей **BLAST** (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) использовали для поиска сходства исследуемых последовательностей с последовательностями, размещенными в международных базах данных. Также были использованы в работе последовательности *Harmonia axyridis* Pall., *Adalia bipunctata* L., *Adalia decempunctata* L., полученные из базы данных GenBank.

Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей мтДНК проведен с помощью программы **MEGA V2.1** [Kumar et. al., 2001].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Анализ первичной структуры 3'-области гена субъединицы цитохромоксидазы десяти видов кокциnellид.

Сравнение нуклеотидных последовательностей фрагмента гена субъединицы I цитохромоксидазы десяти видов кокциnellид показало,

что доля переменных сайтов исследуемой области мтДНК составляет 40% (рис. 1). Данный участок характеризуется значительным накоплением мутаций в третьем положении кодонов (70% от количества переменных сайтов). Нами был рассмотрен нуклеотидный состав секвенированного участка мтДНК для десяти видов божьих коровок. Распределение нуклеотидов участка гена субъединицы I цитохромоксидазы в трех положениях кодонов у всех изученных видов имеет сходную картину. Доля нуклеотидов А/Т (среднее значение) составляет 72,6% от общего количества, а доля G/C значительно меньше - 27,4%. Распределение нуклеотидов в трех положениях кодонов представлено в таблице 1, а также представлено графически на рисунке 2.

С использованием компьютерного анализа установлены генетические дистанции между десятью видами божьих коровок методом оценки p-расстояний (таблица 2). Оценка дивергенции участка гена субъединицы I цитохромоксидазы показала, что нуклеотидная изменчивость исследуемой мтДНК варьирует следующим образом: внутривидовая от 0,6% до 1,3%, межвидовая от 7% до 10%, межродовая от 10% (между представителями трибы *Coccinellini*) до 21% (между представителями разных триб).

Аминокислотная изменчивость части белка субъединицы I цитохромоксидазы составляет: внутривидовая от 0 до 1% замен, межвидовая от 3% до 8% замен, межродовая внутри трибы *Coccinellini* достигает 16% замен (табл. 3, рис. 3).

Нуклеотидная изменчивость, исследуемого участка мтДНК примерно сходна с вариабельностью гена субъединицы I цитохромоксидазы видов из других семейств жуков: межвидовая дивергенция последовательностей субъединицы I цитохромоксидазы гораздо ниже межродовой, которая варьирует в разных семействах жесткокрылых (отряд *Coleoptera*) от 12% до 18%. Внутри родов минимальные значения были отмечены между близкородственными видами - 1% для рода *Denonectes* (*Dytiscidae*) [Ribera et al., 2001], рода *Tetraopes* (*Cerambycidae*) [Farrel, 2001], 1,3% для *Cicindela* (*Cicindelidae*) [Vogler, DeSalle, 1993], а максимальные значения достигали 16%.

1. <i>Harmonia axyridis</i>	GTA AAC CTA ACA TTT TTT CCT CAA CAC TTC TYA GGA UTA AGA GGG ATA CCT CGA CGA TAC TCT GAT TAT CCT GAT-75
2. <i>Harmonia axyridis</i> *	...
3. <i>Adalia bipunctata</i>	...
4. <i>Adalia decempunctata</i>	...
5. <i>Adalia decempunctata</i> *	...
6. <i>Coccinella quinquepunctata</i>	...
7. <i>C. transversoguttata</i>	...
8. <i>C. transversoguttata</i>	...
9. <i>Coccinella septempunctata</i>	...
10. <i>Semiadalia notata</i>	...
11. <i>Hippodamia tredecimpunctata</i>	...
12. <i>Exochomus quadripustulatus</i>	...
13. <i>Thea vigintiduopunctata</i>	...

1. <i>Harmonia axyridis</i>	GCT TAT TAC AAA TGA AAT AAA ATT TCT TCT ATC GGA TCT ATA ATT TCC TCT ATT AGA ATA ATC TTT ATA ATC TTA-150
2. <i>Harmonia axyridis</i> *	...
3. <i>Adalia bipunctata</i>	...
4. <i>Adalia decempunctata</i>	...
5. <i>Adalia decempunctata</i> *	...
6. <i>Coccinella quinquepunctata</i>	...
7. <i>C. transversoguttata</i>	...
8. <i>C. transversoguttata</i>	...
9. <i>Coccinella septempunctata</i>	...
10. <i>Semiadalia notata</i>	...
11. <i>Hippodamia tredecimpunctata</i>	...
12. <i>Exochomus quadripustulatus</i>	...
13. <i>Thea vigintiduopunctata</i>	...

1. <i>Harmonia axyridis</i>	ATT ATT TGA GAA AGA TTT TAT TCA ATA CTT TTA AGA AAG TTT AAT TCT AAT GTA CCC TCT TTA ATT GAA TGA CTT-225
2. <i>Harmonia axyridis</i> *	...
3. <i>Adalia bipunctata</i>	...
4. <i>Adalia decempunctata</i>	...
5. <i>Adalia decempunctata</i> *	...
6. <i>Coccinella quinquepunctata</i>	...
7. <i>C. transversoguttata</i>	...
8. <i>C. transversoguttata</i>	...
9. <i>Coccinella septempunctata</i>	...
10. <i>Semiadalia notata</i>	...
11. <i>Hippodamia tredecimpunctata</i>	...
12. <i>Exochomus quadripustulatus</i>	...
13. <i>Thea vigintiduopunctata</i>	...

1. <i>Harmonia axyridis</i>	CAA	CTT	TCT	CCT	CCT	AAT	GAA	CAT	TCT	TAT	TCA	GAA	GTA	CCA	ATC	TTA	GCT	CAA	AAA	TTC	TAA	TAT	GCC	AGA	TTA	-300
2. <i>Harmonia axyridis</i>C	-300
3. <i>Adalia bipunctata</i>	...	T.A	..CCT	...	A.TT	...	T.A	AT.	-300
4. <i>Adalia decempunctata</i>	...	T.A	..A	..CCT	...	A.CT	...	T.A	AT.	-300
5. <i>Adalia decempunctata*</i>	...	T.A	..A	..CCT	...	A.CT	...	T.A	ATG	-300
6. <i>Coccinella quinquepunctata</i>	..G	T.A	AG.	..A	..A	AA.	A.T	..T	...	A.	AT.	-300
7. <i>C. transversoguttata</i>A	AG.	AGA	..C	A.C	..T	..A	...	AT.	-300
8. <i>C. transversoguttata</i>A	AG.	AGA	..C	A.C	..T	..A	...	AT.	-300
9. <i>Coccinella septempunctata</i>C	AG.A	AGAG	A.C	..T	..A	...	AT.	-300
10. <i>Semiadalia notata</i>	...	T.A	..CC	..T	...	A.T	..T	..T	...	C	TCC	-300
11. <i>Hippodamia tredecimpunctata</i>	...	T.A	..CT	...	A.C	..T	..T	..T	...	T.C	TC.	-300
12. <i>Kochochus quadripustulatus</i>	..T	TCA	AT.	..A	..T	AGA	A.	..T	..T	...	A.	TT.	-300
13. <i>Thea vigintiduopunctata</i>	...	T.A	..CC	AG.T	..GC	TCA	...	TCY	-300

1	GTG	CAT	TOG	A	-310
2	-310
3	-310
4	-310
5	-310
6	-310
7	-310
8	-310
9	-310
10	-310
11	-310
12	-310
13	-310

Рисунок 1. Сравнение нуклеотидных последовательностей фрагмента гена, кодирующего субъединицу I цитохромоксидазы десяти видов жуков семейства Coccinellidae. Для двух видов использованы нуклеотидные последовательности, полученные из базы данных GenBank (для *Harmonia axyridis**, регистрационный номер AF515054; для *Adalia decempunctata**, регистрационный номер AJ312061). Точками обозначены идентичные нуклеотиды.

Таблица 1. Нуклеотидный состав (в процентах) участка гена субъединицы I цитохромоксидазы в трех положениях кодонов у десяти видов кокцинеллид.

	A	T	G	C
1	31,8	36,5	14,2	17,5
2	26,9	37,0	15,6	20,5
3	43,6	41,9	3,6	10,9

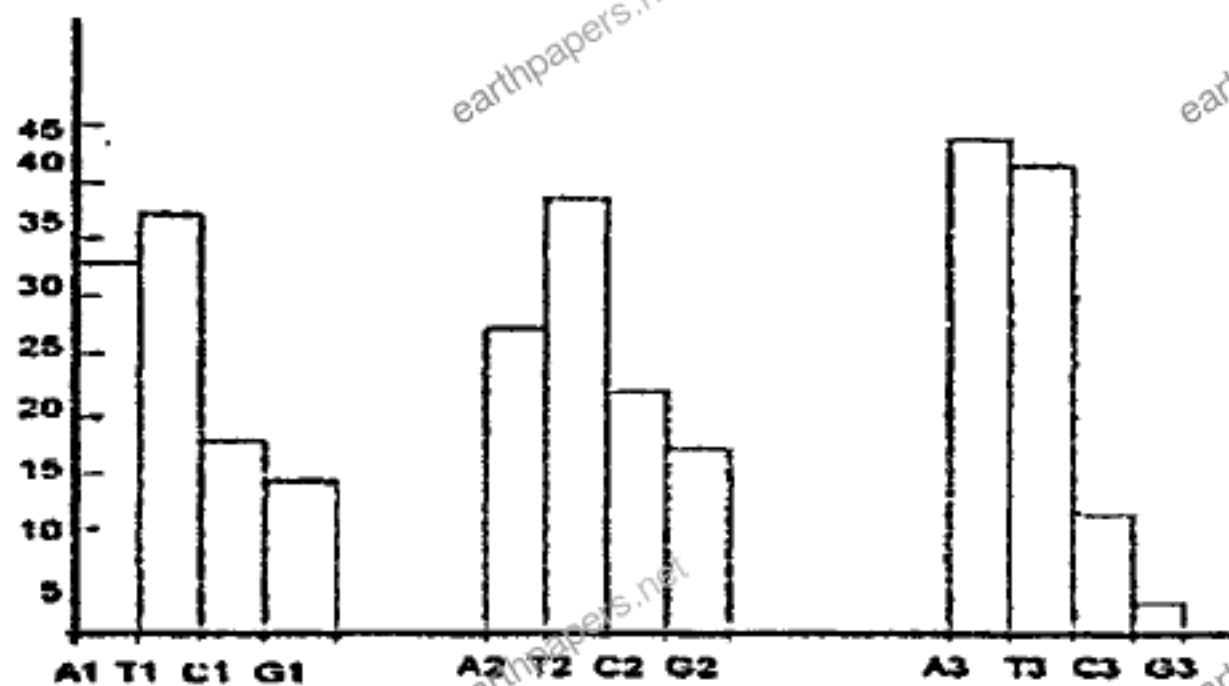


Рис. 2. Нуклеотидный состав участка гена субъединицы I цитохромоксидазы в трех положениях кодонов у десяти видов кокцинеллид.

Реконструкция филогении десяти видов божьих коровок.

Сравнение нуклеотидных последовательностей мтДНК позволило отразить филогенетические связи кокцинеллид (рис. 4, 5). Филогенетические схемы родства божьих коровок, показанные на рисунке 4 и рисунке 5, в целом соответствуют дереву, построенному на основании морфо-экологических критериев [Majerus, 1994], а также совпадают с дендрограммой, полученной в результате сравнения первичной структуры ITS1 кокцинеллид [Schulenburg et al., 2001]. Изученная нами последовательность оказалась хорошим маркером на уровне подсемейств, представленных как родами, близкими морфологически и генетически, так и дальними родами. Так, практически не существует четких морфологических признаков, отделяющих роды *Semiadalia* и *Hippodamia*. Результаты анализа молекулярно-генетических данных четко дифференцируют эти таксоны. Тем не менее

Таблица 2. Оценка нуклеотидных различий участка гена субъединицы I цитохромоксидазы, выраженная в р-расстояниях (отношение наблюдаемого числа замен к общему числу нуклеотидов в исследуемом участке гена).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1. <i>Harmonia axyridis</i>												
2. <i>H. axyridis</i> *	0.013											
3. <i>Adalia bipunctata</i>	0.148	0.148										
4. <i>A. decempunctata</i>	0.174	0.171	0.071									
5. <i>A. decempunctata</i> *	0.181	0.177	0.077	0.006								
6. <i>Coccinella quinquepunctata</i>	0.152	0.155	0.132	0.139	0.139							
7. <i>Coccinella transversoguttata</i>	0.158	0.161	0.152	0.155	0.165	0.100						
8. <i>Coccinella transversoguttata</i> *	0.155	0.158	0.148	0.158	0.168	0.100	0.006					
9. <i>Coccinella septempunctata</i>	0.168	0.171	0.171	0.165	0.174	0.106	0.071	0.077				
10. <i>Semiadalia notata</i>	0.161	0.161	0.123	0.155	0.158	0.148	0.135	0.139	0.165			
11. <i>Hippodamia tredecimpunctata</i>	0.155	0.161	0.126	0.145	0.155	0.155	0.132	0.135	0.174	0.100		
12. <i>Exochomus quadripustulatus</i>	0.213	0.213	0.190	0.203	0.210	0.184	0.190	0.190	0.197	0.194	0.210	
13. <i>Thea vigintiduopunctata</i>	0.203	0.194	0.168	0.181	0.184	0.187	0.177	0.181	0.181	0.184	0.190	0.216

Примечание. Нуклеотидные последовательности видов, помеченных звездочкой, получены из базы данных GenBank.

Таблица 3. Оценка аминокислотных различий С-концевого участка субъединицы I цитохромоксидазы, выраженная в р-расстояниях (отношение наблюдаемого числа замен к числу аминокислотных остатков).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1. <i>Harmonia axyridis</i>												
2. <i>H. axyridis</i> *	0.010											
3. <i>Adalia bipunctata</i>	0.137	0.147										
4. <i>A. decempunctata</i>	0.157	0.167	0.029									
5. <i>A. decempunctata</i> *	0.157	0.167	0.029	0.000								
6. <i>Coccinella quinquepunctata</i>	0.167	0.176	0.088	0.118	0.118							
7. <i>Coccinella transversoguttata</i>	0.157	0.167	0.108	0.137	0.137	0.049						
8. <i>Coccinella transversoguttata</i> *	0.157	0.167	0.108	0.137	0.137	0.049	0.000					
9. <i>Coccinella septempunctata</i>	0.157	0.167	0.137	0.157	0.157	0.078	0.029	0.029				
10. <i>Semiadalia notata</i>	0.127	0.137	0.088	0.118	0.118	0.108	0.098	0.098	0.127			
11. <i>Hippodamia tredecimpunctata</i>	0.127	0.127	0.098	0.127	0.127	0.118	0.108	0.108	0.137	0.029		
12. <i>Exochomus quadripustulatus</i>	0.258	0.265	0.265	0.275	0.275	0.275	0.294	0.294	0.284	0.235	0.265	
13. <i>Thea vigintiduopunctata</i>	0.186	0.176	0.167	0.176	0.176	0.167	0.157	0.157	0.186	0.167	0.167	0.275

Примечание. Нуклеотидные последовательности видов, помеченных звездочкой, были взяты из базы данных GenBank.

<i>Harmonia axyridis</i>	VNLTFPPQHF	LGLSGMPEAY	SDYDAYYKW	NKISSIGSMI	SSIEMIFMIL	IIWESFYSMR	LSKFNNSNVP	LIWLQL
<i>Harmonia axyridis</i> (GenBank)L.....
<i>Adalia bipunctata</i>M.....IL.....	..VL..LI.....F.....	..T...YM..
<i>Adalia decempunctata</i>M.....	..V....IL.....	..VM..LI.....F.L.....	..T...YM..
<i>Adalia decempunctata</i> (GenBank)M.....	..V....IL.....	..VM..LI.....G.P.L.....	..T...YM..
<i>Coccinella quinquepunctata</i>N.....M.....IP.....	..VL..LI.....M.....	..Y.M.T.....	..F..
<i>Coccinella transversoguttata</i>N.....M.....IP.....	..VL..LI.....M.....	..F.I.T.....	..F..
<i>Coccinella transversoguttata</i>N.....M.....IP.....	..VL..LI.....M.....	..F.I.T.....	..F..
<i>Coccinella septempunctata</i>N.....M.....VP.....	..V...LI.....	..M.....	..M...F.I.T.....	..F..
<i>Semiadalia notata</i>M.....I.....	..T..IL..LI.....M.....	..L.I.....
<i>Hippodamia tredecimpunctata</i>M.....I.....	..M..IL..MI.....M.....	..L.I.....
<i>Exochomus quadripustulatus</i>SF.....L.....	..T..I..MFLN.....	..L...M..T.....	..INLN.N.M.....	..MRS
<i>Thea vigintiduopunctata</i>	..L.....FM.....	..V....IF.....	..L.VLM.LI.....I.....	..L..TM.....	..M..
<i>Harmonia axyridis</i>	SPFNEHSYSE	VPILAQKF*Y	GSLVHW					
<i>Harmonia axyridis</i> (GenBank)					
<i>Adalia bipunctata</i>	I...SM.....					
<i>Adalia decempunctata</i>	I...SM.....					
<i>Adalia decempunctata</i> (GenBank)	I...SM.....					
<i>Coccinella quinquepunctata</i>N...	I...TN.....					
<i>Coccinella transversoguttata</i>	I..M..M.....					
<i>Coccinella transversoguttata</i>	I..M..M.....					
<i>Coccinella septempunctata</i>	I..M..M.....					
<i>Semiadalia notata</i>	I...SS.....					
<i>Hippodamia tredecimpunctata</i>	I...SS.....					
<i>Exochomus quadripustulatus</i>	I..I.....	M...TL.....					
<i>Thea vigintiduopunctata</i>L..S.....					

Рисунок 3. Сравнение аминокислотных последовательностей участка белка субъединицы I цитохромоксидазы. Точками обозначены идентичные аминокислотные остатки.

они оказываются наиболее родственными по сравнению с другими членами семейства. Эти результаты не удивляют, поскольку роды *Semiadalia* и *Hippodamia* входят в подтрибу *Hippodamiini*.

Полученные нами данные позволили выявить филогенетические связи внутри рода *Coccinella*. Вид *Coccinella quinquepunctata* значительно удален от других представителей рода *Coccinella*. Морфологически он имеет также наименьшее сходство с *Coccinella transversoguttata* и *Coccinella septempunctata*. Виды трибы Coccinellini, являющиеся афидофагами, образуют монофилетичную группу, значительно удаленную от представителя трибы Chilacorini, вида-кокцидофага *Exochomus quadripustulatus*. Вид *Thea vigintiduopunctata* L, являющийся мицетофагом (триба Psylloborini), филогенетически близок к трибе Coccinellini. Известно, что признаки строения ротового аппарата мицетофагов имеют сходство с особенностями строения ротового аппарата как афидофагов, так и фитофагов. Таким образом, можно предположить, что в эволюции кокцинеллид происходит смена пищевой специализации.

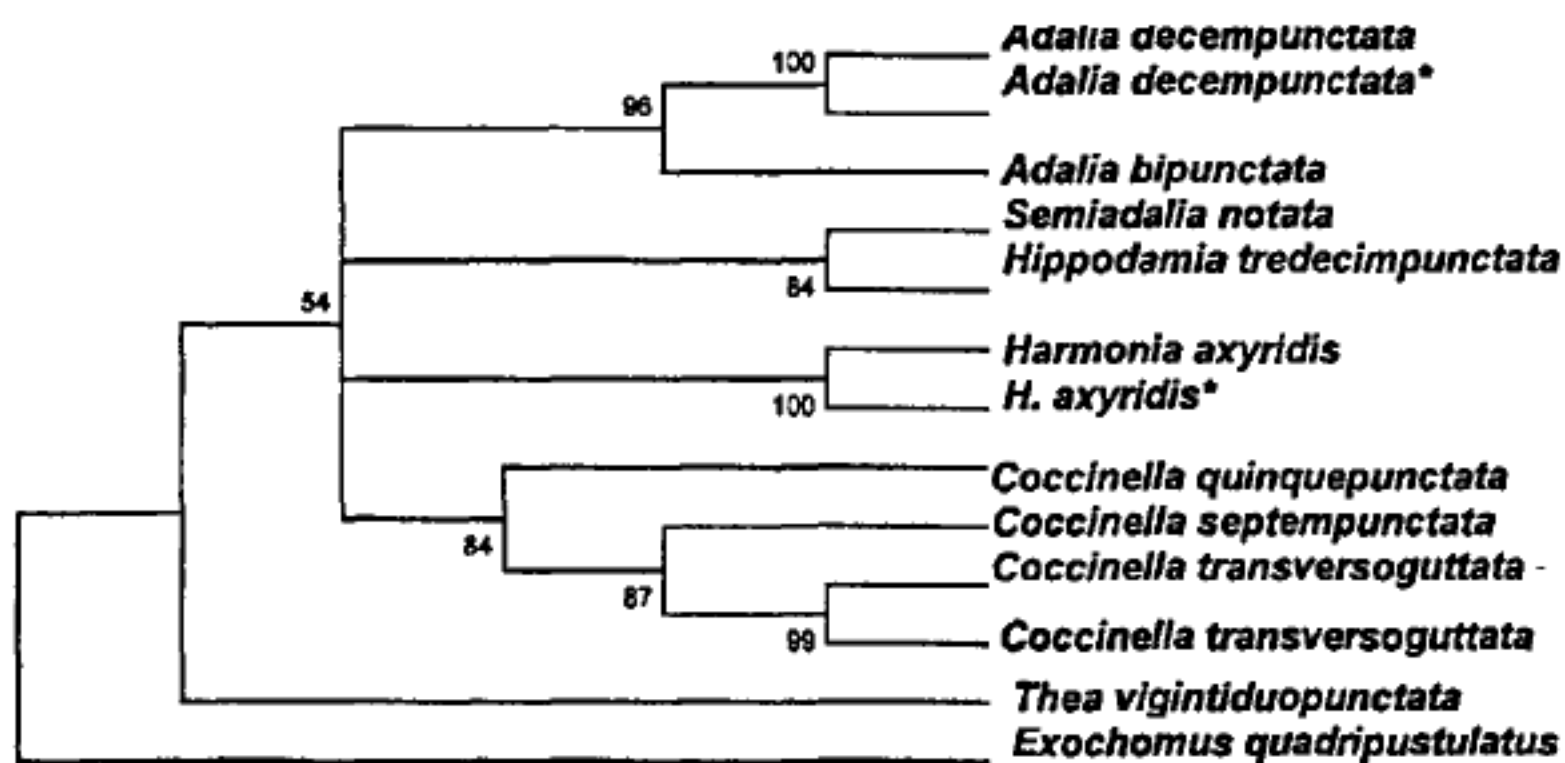


Рисунок 4. Филогения кокцинеллид. Дендрограмма построена с использованием метода максимальной экономии. Бутстрэп-анализ проведен на 500 повторностях. Величины бутстрэп-коэффициентов обозначены в местах разветвлений филогенетического дерева. Нуклеотидные последовательности видов, помеченных звездочкой, получены из базы данных GenBank.

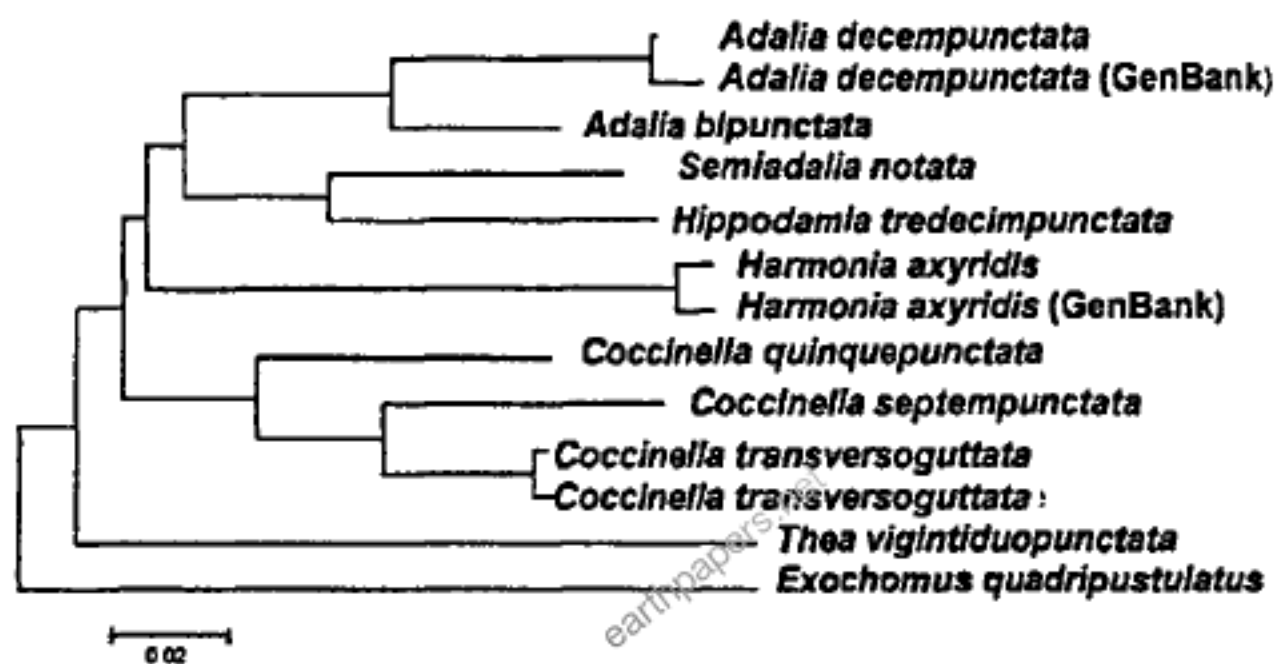


Рисунок 5. Филогения десяти видов кокциnellид. Дендрограмма построена методом ближайшего связывания с использованием алгоритма Кимуры, с учетом замен в трех положениях кодона. Нуклеотидные последовательности видов, помеченных звездочкой, получены из базы данных GenBank. Масштаб дан в доле нуклеотидных различий.

2. Анализ изменчивости нуклеотидных последовательностей участка митохондриального гена субъединицы I цитохромоксидазы ВНУТРИ вида *Adalia bipunctata*.

Известно, что мтДНК характеризуется сравнительно высокой скоростью эволюции нуклеотидных последовательностей в отличие от ядерной ДНК. Это дает нам возможность сравнивать близкородственные таксоны насекомых (виды, подвиды). Митохондриальная ДНК является чувствительным индикатором к воздействию демографических процессов на популяции. На структуру популяций могут оказывать влияние в различной степени определенные эволюционные процессы, такие как обмен генами между популяциями, вымирание субпопуляций, миграции и соответственно эффект основателя, прохождение популяций через "горлышко бутылки". Последний фактор обладает наиболее жестким воздействием на изменчивость митохондриальную ДНК как маркера генетической структуры групп организмов. Он сказывается на степени полиморфизма нуклеотидных последовательностей, и скорость снижения полиморфизма этого маркера в случае недавнего события прохождения через «бутылочное горло» будет высокой. При этом

последующий рост численности популяции может предотвратить полную элиминацию вариабельности мтДНК. Обмен генами играет также существенную роль в эволюции вида. В случае, если имел место интенсивный обмен генами между популяциями, то вероятность низких значений генетических дистанций в анализе структуры популяций будет высокой.

До последнего времени оставался спорным таксономический статус центрально - азиатских популяций *Adalia bipunctata*, которые имеют особый тип полиморфизма (f. *fasciatorpunctata*), отличающего "азиатских" адалий по окраске и рисунку переднеспинки и надкрылий от других форм этого вида. Нами был проведен анализ на молекулярно - генетическом уровне двух наиболее удаленных популяций адалий - из Италии и Тувы. Выборка из тувинской популяции была представлена жуками форм f. *bipunctata* и *fasciatorpunctata*. Кроме того, для сравнения мы использовали нуклеотидные последовательности образцов из Болгарии и Санкт-Петербурга и одного из Москвы. Последний получен из базы данных GenBank (AJ313070). Полученные данные свидетельствуют о том, что среди жуков *A. bipunctata* из разных популяций преобладает один вариант мтДНК, названный нами "типичным", который был выявлен у 16 особей из 27 и найден в популяциях Италии, Москвы, Санкт-Петербурга, Тувы (рис. 6). Всего было обнаружено 12 вариантов (мт-гаплотипов), представленных в основном единичными особями, причем девять из этих вариантов отличаются от типичного по одной - двум заменам. Два гаплотипа - 25 и 26 - оказались наиболее отличающимися. Первый был найден в Туве, второй - в Болгарии. Отличие этих вариантов от типичного - 11 нуклеотидов (3,6%) и 9 нуклеотидов (3%) соответственно, что, однако, значительно меньше, чем различия между *A. bipunctata* и *A. decempunctata* (7%). Сопоставление внутри и межвидовой изменчивости внутри семейства Coccinellidae, описанное в разделе 1, позволяет сделать вывод, что генетическая изменчивость участка гена субъединицы I цитохромоксидазы вида *A. bipunctata* соответствует показателям внутривидовой изменчивости. Таким образом, несмотря на резкие морфологические различия особей из европейских и центрально - азиатских популяций *A. bipunctata*, а также

географическую удаленность исследованных популяций и принадлежность к разным климатическим зонам, характер изменчивости мтДНК не позволяет четко их дифференцировать.

Сравнительный анализ аминокислотных последовательностей части белка субъединицы I цитохромоксидазы выявил единичные замены аминокислот (рис. 7) как между популяциями, так и внутри популяций.

Сложно назвать причины низкого генетического разнообразия внутри вида *A. bipunctata*. Можно сказать, что расхождение двух географически удаленных популяций является недавним событием (до 1 млн. лет) по сравнению с расхождением *A. bipunctata* и *A. decempunctata*. Возможно, что время независимого существования *A. bipunctata fasciata* и *A. bipunctata bipunctata* мало для того, чтобы популяции накопили изменения, дифференцировавшие их по генетическим признакам.

Нами показано, что характер выявленного в природных популяциях полиморфизма мтДНК отражает общее состояние видообразования комплекса близких форм - *A. bipunctata*, которые образуют цепь географически замещающих популяций подвидового ранга, не изолированных строго друг от друга генетическими механизмами. Полученные данные еще раз подтверждают выводы, полученные ранее на основе генетического анализа, что нет оснований придавать форме *fasciata* видовой ранг [Лусис, 1973]. Следует сказать, что только по результатам исследования одного молекулярного маркера мы не можем делать однозначных выводов по поводу таксономического статуса тувинских популяций божьих коровок. Привлечение других методов и использование других маркеров необходимо для изучения форм *A. bipunctata*.

3. Сравнительный анализ полиморфизма длин внутренних транскрибируемых спейсеров рДНК кокцинеллид.

Молекулярно-генетическая организация рДНК различных эукариот во многом сходна, в то же время- каждый вид обладает рядом структурных и функциональных особенностей, характерных для данного

17 GTAAACCTAACATTTTTCCTCAACATTTCTTAGGATTAAGAGGAAATACCAAGACGATATCTGATTACCCAGATGCTTATTAATATATGAAATTAAGATTTTCAT-103
 27 GTAAACCTAACATTTTTCCTCAACATTTCTTAGGATTAAGAGGAAATACCAAGACGATATCTGATTACCCAGATGCTTATTAATATATGAAATTAAGATTTTCAT-103
 37 GTAAACCTAACATTTTTCCTCAACATTTCTTAGGATTAAGAGGAAATACCAAGACGATATCTGATTACCCAGATGCTTATTAATATATGAAATTAAGATTTTCAT-103
 47 GTAAACCTAACATTTTTCCTCAACATTTCTTAGGATTAAGAGGAAATACCAAGACGATATCTGATTACCCAGATGCTTATTAATATATGAAATTAAGATTTTCAT-103
 57 GTAAACCTAACATTTTTCCTCAACATTTCTTAGGATTAAGAGGAAATACCAAGACGATATCTGATTACCCAGATGCTTATTAATATATGAAATTAAGATTTTCAT-103
 67 GTAAACCTAACATTTTTCCTCAACATTTCTTAGGATTAAGAGGAAATACCAAGACGATATCTGATTACCCAGATGCTTATTAATATATGAAATTAAGATTTTCAT-103
 77 GTAAACCTAACATTTTTCCTCAACATTTCTTAGGATTAAGAGGAAATACCAAGACGATATCTGATTACCCAGATGCTTATTAATATATGAAATTAAGATTTTCAT-103
 87 GTAAACCTAACATTTTTCCTCAACATTTCTTAGGATTAAGAGGAAATACCAAGACGATATCTGATTACCCAGATGCTTATTAATATATGAAATTAAGATTTTCAT-103
 97 GTAAACCTAACATTTTTCCTCAACATTTCTTAGGATTAAGAGGAAATACCAAGACGATATCTGATTACCCAGATGCTTATTAATATATGAAATTAAGATTTTCAT-103
 107 GTAAACCTAACATTTTTCCTCAACATTTCTTAGGATTAAGAGGAAATACCAAGACGATATCTGATTACCCAGATGCTTATTAATATATGAAATTAAGATTTTCAT-103
 117 GTAAACCTAACATTTTTCCTCAACATTTCTTAGGATTAAGAGGAAATACCAAGACGATATCTGATTACCCAGATGCTTATTAATATATGAAATTAAGATTTTCAT-103
 127 GTAAACCTAACATTTTTCCTCAACATTTCTTAGGATTAAGAGGAAATACCAAGACGATATCTGATTACCCAGATGCTTATTAATATATGAAATTAAGATTTTCAT-103
 137 GTAAACCTAACATTTTTCCTCAACATTTCTTAGGATTAAGAGGAAATACCAAGACGATATCTGATTACCCAGATGCTTATTAATATATGAAATTAAGATTTTCAT-103
 147 GTAAACCTAACATTTTTCCTCAACATTTCTTAGGATTAAGAGGAAATACCAAGACGATATCTGATTACCCAGATGCTTATTAATATATGAAATTAAGATTTTCAT-103
 157 GTAAACCTAACATTTTTCCTCAACATTTCTTAGGATTAAGAGGAAATACCAAGACGATATCTGATTACCCAGATGCTTATTAATATATGAAATTAAGATTTTCAT-103
 167 GTAAACCTAACATTTTTCCTCAACATTTCTTAGGATTAAGAGGAAATACCAAGACGATATCTGATTACCCAGATGCTTATTAATATATGAAATTAAGATTTTCAT-103
 177 GTAAACCTAACATTTTTCCTCAACATTTCTTAGGATTAAGAGGAAATACCAAGACGATATCTGATTACCCAGATGCTTATTAATATATGAAATTAAGATTTTCAT-103
 187 GTAAACCTAACATTTTTCCTCAACATTTCTTAGGATTAAGAGGAAATACCAAGACGATATCTGATTACCCAGATGCTTATTAATATATGAAATTAAGATTTTCAT-103

17 CATTGGATCTATTTTATCCTCAATAGAGTTTTATTATATTAATTAATTTTGGAAAGATTTTTCTATACGATTAACAAAATTTAATTAATATACC-206
 27 CATTGGATCTATTTTATCCTCAATAGAGTTTTATTATATTAATTAATTTTGGAAAGATTTTTCTATACGATTAACAAAATTTAATTAATATACC-206
 37 CATTGGATCTATTTTATCCTCAATAGAGTTTTATTATATTAATTAATTTTGGAAAGATTTTTCTATACGATTAACAAAATTTAATTAATATACC-206
 47 CATTGGATCTATTTTATCCTCAATAGAGTTTTATTATATTAATTAATTTTGGAAAGATTTTTCTATACGATTAACAAAATTTAATTAATATACC-206
 57 CATTGGATCTATTTTATCCTCAATAGAGTTTTATTATATTAATTAATTTTGGAAAGATTTTTCTATACGATTAACAAAATTTAATTAATATACC-206
 67 CATTGGATCTATTTTATCCTCAATAGAGTTTTATTATATTAATTAATTTTGGAAAGATTTTTCTATACGATTAACAAAATTTAATTAATATACC-206
 77 CATTGGATCTATTTTATCCTCAATAGAGTTTTATTATATTAATTAATTTTGGAAAGATTTTTCTATACGATTAACAAAATTTAATTAATATACC-206
 87 CATTGGATCTATTTTATCCTCAATAGAGTTTTATTATATTAATTAATTTTGGAAAGATTTTTCTATACGATTAACAAAATTTAATTAATATACC-206
 97 CATTGGATCTATTTTATCCTCAATAGAGTTTTATTATATTAATTAATTTTGGAAAGATTTTTCTATACGATTAACAAAATTTAATTAATATACC-206
 107 CATTGGATCTATTTTATCCTCAATAGAGTTTTATTATATTAATTAATTTTGGAAAGATTTTTCTATACGATTAACAAAATTTAATTAATATACC-206
 117 CATTGGATCTATTTTATCCTCAATAGAGTTTTATTATATTAATTAATTTTGGAAAGATTTTTCTATACGATTAACAAAATTTAATTAATATACC-206
 127 CATTGGATCTATTTTATCCTCAATAGAGTTTTATTATATTAATTAATTTTGGAAAGATTTTTCTATACGATTAACAAAATTTAATTAATATACC-206
 137 CATTGGATCTATTTTATCCTCAATAGAGTTTTATTATATTAATTAATTTTGGAAAGATTTTTCTATACGATTAACAAAATTTAATTAATATACC-206
 147 CATTGGATCTATTTTATCCTCAATAGAGTTTTATTATATTAATTAATTTTGGAAAGATTTTTCTATACGATTAACAAAATTTAATTAATATACC-206
 157 CATTGGATCTATTTTATCCTCAATAGAGTTTTATTATATTAATTAATTTTGGAAAGATTTTTCTATACGATTAACAAAATTTAATTAATATACC-206
 167 CATTGGATCTATTTTATCCTCAATAGAGTTTTATTATATTAATTAATTTTGGAAAGATTTTTCTATACGATTAACAAAATTTAATTAATATACC-206
 177 CATTGGATCTATTTTATCCTCAATAGAGTTTTATTATATTAATTAATTTTGGAAAGATTTTTCTATACGATTAACAAAATTTAATTAATATACC-206
 187 CATTGGATCTATTTTATCCTCAATAGAGTTTTATTATATTAATTAATTTTGGAAAGATTTTTCTATACGATTAACAAAATTTAATTAATATACC-206

17 ATCTCTAATGAAATGACTACAAATATCCCTCCSTAAAGAACATTCCTATTCTGAAATTCGAAATTTATCAATAAAATTCCTAATATGGCAGATTAGTGCATTGGA-310
 27 ATCTCTAATGAAATGACTACAAATATCCCTCCSTAAAGAACATTCCTATTCTGAAATTCGAAATTTATCAATAAAATTCCTAATATGGCAGATTAGTGCATTGGA-310
 37 ATCTCTAATGAAATGACTACAAATATCCCTCCSTAAAGAACATTCCTATTCTGAAATTCGAAATTTATCAATAAAATTCCTAATATGGCAGATTAGTGCATTGGA-310
 47 ATCTCTAATGAAATGACTACAAATATCCCTCCSTAAAGAACATTCCTATTCTGAAATTCGAAATTTATCAATAAAATTCCTAATATGGCAGATTAGTGCATTGGA-310
 57 ATCTCTAATGAAATGACTACAAATATCCCTCCSTAAAGAACATTCCTATTCTGAAATTCGAAATTTATCAATAAAATTCCTAATATGGCAGATTAGTGCATTGGA-310
 67 ATCTCTAATGAAATGACTACAAATATCCCTCCSTAAAGAACATTCCTATTCTGAAATTCGAAATTTATCAATAAAATTCCTAATATGGCAGATTAGTGCATTGGA-310
 77 ATCTCTAATGAAATGACTACAAATATCCCTCCSTAAAGAACATTCCTATTCTGAAATTCGAAATTTATCAATAAAATTCCTAATATGGCAGATTAGTGCATTGGA-310
 87 ATCTCTAATGAAATGACTACAAATATCCCTCCSTAAAGAACATTCCTATTCTGAAATTCGAAATTTATCAATAAAATTCCTAATATGGCAGATTAGTGCATTGGA-310
 97 ATCTCTAATGAAATGACTACAAATATCCCTCCSTAAAGAACATTCCTATTCTGAAATTCGAAATTTATCAATAAAATTCCTAATATGGCAGATTAGTGCATTGGA-310
 107 ATCTCTAATGAAATGACTACAAATATCCCTCCSTAAAGAACATTCCTATTCTGAAATTCGAAATTTATCAATAAAATTCCTAATATGGCAGATTAGTGCATTGGA-310
 117 ATCTCTAATGAAATGACTACAAATATCCCTCCSTAAAGAACATTCCTATTCTGAAATTCGAAATTTATCAATAAAATTCCTAATATGGCAGATTAGTGCATTGGA-310
 127 ATCTCTAATGAAATGACTACAAATATCCCTCCSTAAAGAACATTCCTATTCTGAAATTCGAAATTTATCAATAAAATTCCTAATATGGCAGATTAGTGCATTGGA-310
 137 ATCTCTAATGAAATGACTACAAATATCCCTCCSTAAAGAACATTCCTATTCTGAAATTCGAAATTTATCAATAAAATTCCTAATATGGCAGATTAGTGCATTGGA-310
 147 ATCTCTAATGAAATGACTACAAATATCCCTCCSTAAAGAACATTCCTATTCTGAAATTCGAAATTTATCAATAAAATTCCTAATATGGCAGATTAGTGCATTGGA-310
 157 ATCTCTAATGAAATGACTACAAATATCCCTCCSTAAAGAACATTCCTATTCTGAAATTCGAAATTTATCAATAAAATTCCTAATATGGCAGATTAGTGCATTGGA-310
 167 ATCTCTAATGAAATGACTACAAATATCCCTCCSTAAAGAACATTCCTATTCTGAAATTCGAAATTTATCAATAAAATTCCTAATATGGCAGATTAGTGCATTGGA-310
 177 ATCTCTAATGAAATGACTACAAATATCCCTCCSTAAAGAACATTCCTATTCTGAAATTCGAAATTTATCAATAAAATTCCTAATATGGCAGATTAGTGCATTGGA-310
 187 ATCTCTAATGAAATGACTACAAATATCCCTCCSTAAAGAACATTCCTATTCTGAAATTCGAAATTTATCAATAAAATTCCTAATATGGCAGATTAGTGCATTGGA-310

Рисунок 6. Сравнение нуклеотидных последовательностей (310 пн) 3'- области гена субъединицы I цитохромоксидазы вида *Adalia bipunctata* из разных популяций. 1Т-9Т – Италия; 10Т – Санкт-Петербург; 11Т-25Т – Тува; 26Т – Болгария; 27Т – Москва; 28Т – *Adalia decempunctata*.

1	VNLTFPPQHF	LGLSGMPRRY	SDYPDAYMR	NKISSIGSIL	SSISVLFMLI	IIWESFFSMR	LTKFNVMMS	LIEWLQL
2M.
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15M.
16
17
18
19
20
21P.
22C
23
24
25V.....I.....
26V.....
27
28TV.....M.....L.....
1	SPPNEHSYSE	IPILSMKF*Y	GSLVHW					
2A.....					
3					
4					
5					
6					
7					
8P.....					
9					
10					
11					
12					
13					
14					
15					
16					
17					
18					
19					
20					
21					
22					
23					
24					
25V.....					
26					
27					
28					

Рисунок 7. Сравнение аминокислотных последовательностей С – концевого участка субъединицы I цитохромоксидазы вида *Adalia bipunctata* из разных популяций: 1 -9 – Италия; 10 – Санкт – Петербург; 11 – 25 – Тува; 26 – Болгария; 27 – Москва, 28 – *A. decempunctata*.

участка генома. Характерной особенностью рДНК является то, что различные структурные элементы эволюционируют с разной скоростью. Наименее эволюционно консервативными являются транскрибируемые и нетранскрибируемые спейсеры. Их сравнительный анализ эффективен

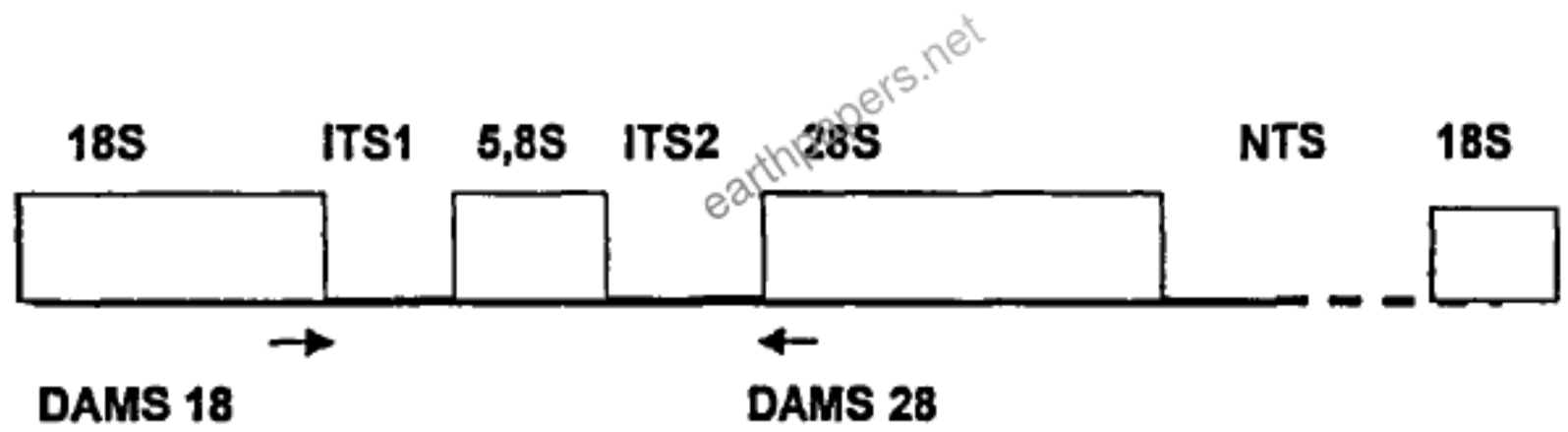
при исследовании филогенетических взаимоотношений между близкородственными видами. Для эволюции рДНК известны два типа преобразований: постепенное накопление нуклеотидных замен и сальтационные изменения, выражающиеся в перестройках рибосомального оперона [Алешин и др., 1995; Муха и др., 1999,]. Показано, что сальтационные изменения играют большую роль в эволюции видов [Муха и др., 1999]

Методом ПЦР при амплификации участка генома, включающего ITS1, 5.8S, ITS2, с использованием универсальных праймеров DAMS_18 и DAMS_28 [Муха и Сидоренко, 1995; 1996] нами были выявлены различия в длине фрагмента рДНК, содержащего транскрибируемые спейсеры, у пяти видов божьих коровок (рис. 8). Этот результат согласуется с литературными данными по вариабельности ITS1 у видов семейства Coccinellidae.

При сравнении двух видов *Adalia bipunctata* и *Adalia decempunctata* обнаружена вставка в исследуемую область рДНК *Adalia bipunctata*. В то же время мы не выявили различий на внутривидовом уровне. Нами показано, что коровки *A. bipunctata fasciatopunctata* и *A. bipunctata bipunctata* не различаются по длине фрагмента рДНК, включающего внутренние транскрибируемые спейсеры (рис.9). Длина фрагмента рДНК не различается также и внутри вида *Coccinella septempunctata* из географически удаленных популяций (рис. 10).

С нашей точки зрения, характер изменчивости транскрибируемых спенсеров рибосомной ДНК исследованных видов божьих коровок не может быть объяснен с позиции теории нейтральной эволюции [Кимура, 1985]. Более адекватной представляется интерпретация полученных результатов с позиции теории генетического мономорфизма [Алтухов, 2003], согласно которой видообразование трактуется не как постепенный вероятностный процесс, протекающий на популяционном уровне, а как следствие качественных реорганизаций генома.

Приведенные выше данные позволяют считать, что сальтационные изменения, выражающиеся в перестройках рибосомального оперона, играют большую роль в эволюции видов семейства Coccinellidae.



Б

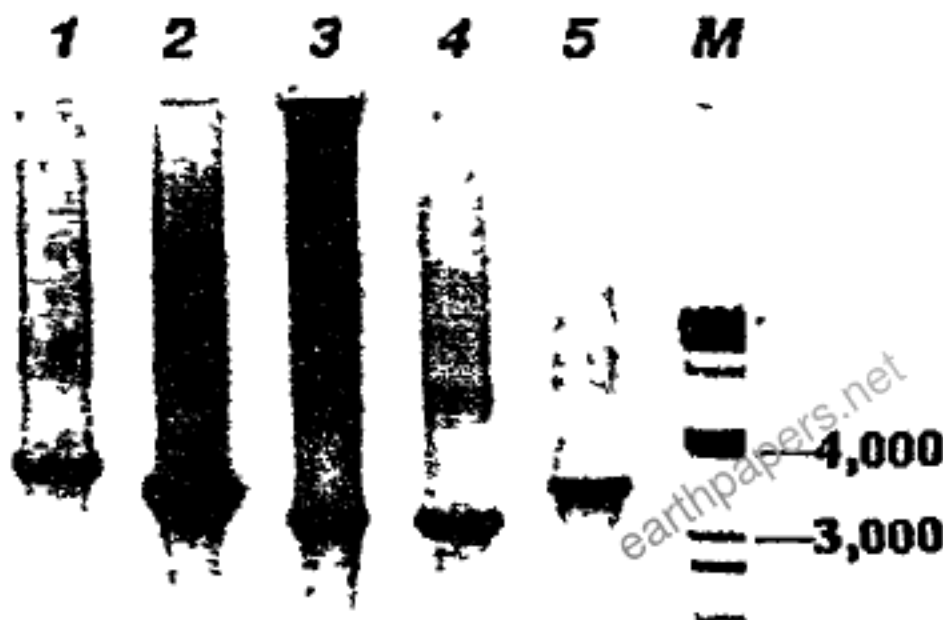


Рисунок 8. А - Схема строения кластера рибосомных генов божьих коровок, Б - Электрофорез продуктов ПЦР (область ITS1, 5 8S, ITS2), полученных при амплификации рДНК божьих коровок . 1 - *Adaha bipunctata*, 2 - *Propylea quatuordecimpunctata*, 3 - *Chilocorus rempustulatus*, 4 - *Coccinella quinquepunctata*, 5 - *Adalia decempunctata*, М - маркер, полученный расщеплением ДНК фага лямбда эндонуклеазой *PstI* (цифрами справа обозначены длины *PstI* • фрагментов в п н)

Можно предположить, что видообразование божьих коровок сопровождалась освоением новых экологических ниш, для которых более адаптивными являлись разные уровни интенсивности метаболизма и, следовательно, различная интенсивность синтеза рРНК, которая определяется, в частности, структурой транскрибируемых спейсеров

В настоящее время остается открытым вопрос о конкретных механизмах, лежащих в основе качественной смены структуры

рибосомной ДНК в процессе эволюции видов. В то же время показано, что меж- и/или внутрихромосомная геновая конверсия лежит в основе изогенизации членов мультигенного семейства и их согласованной, "концертной" эволюции [Dover, 1982]. Можно предположить, что процесс изогенизации происходит неравномерно по всей длине мультигенного семейства. Новые структурные варианты, возникающие в рДНК, могут оказаться селективно выгодными в новых условиях окружающей среды. Избирательная магнификация генов рРНК, описанная в экспериментах на *D. melanogaster* [Hawley et al., 1985], и направленная ("полярная") геновая конверсия [Dover, 1982] - два механизма, благодаря которым новый структурный вариант может стать основным членом мультигенного семейства.

Подчеркнем, что в описанной гипотетической схеме изменчивости божьих коровок особое внимание уделяется генетическим событиям, происходящим на уровне особи. Именно определенный структурный вариант рибосомной ДНК, магнифицированный в клетках полового пути конкретной особи, является основой для формирования кластера рибосомных генов нового вида. Этот подход, с нашей точки зрения, хорошо согласуется с постулатами теории генетического мономорфизма, согласно которой, в частности, "любой вид по генетически мономорфной части генома предстает перед нами как отдельная особь" [Алтухов, 2003].

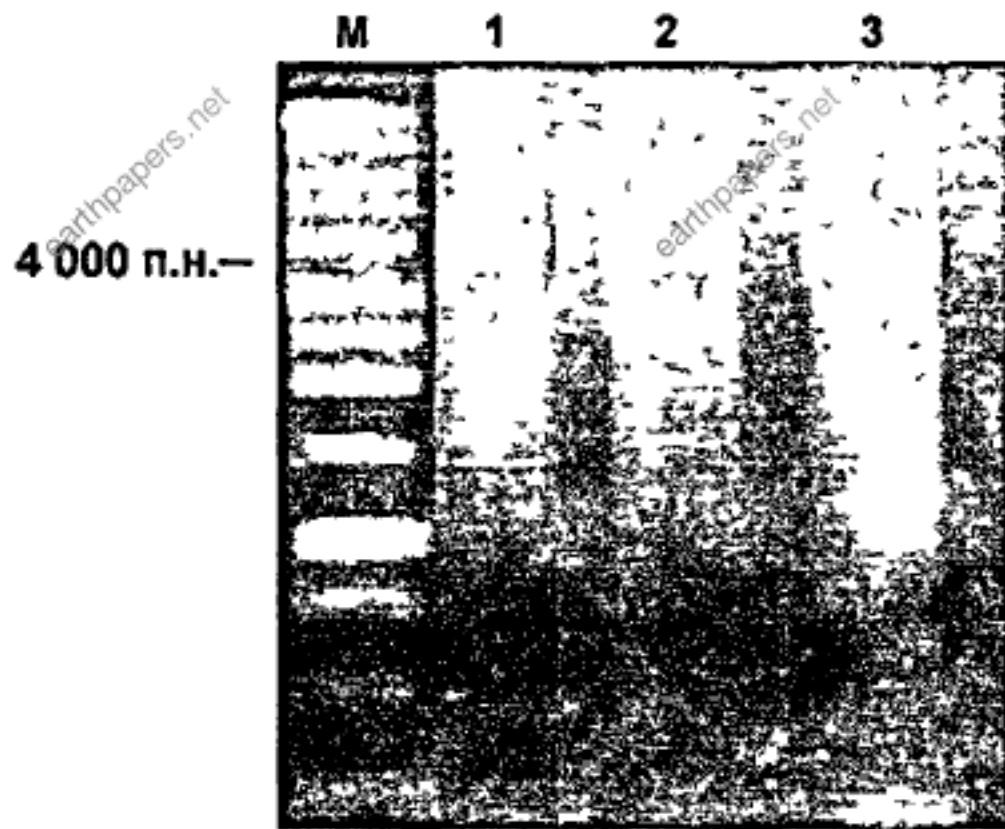


Рисунок 9. Электрофорез продуктов ПЦР (область ITS1, 5.8S, ITS2), полученных при амплификации рДНК божьих коровок : 1 - *Adalia bipunctata bipunctata*, 2, 3 - *Adalia bipunctata fasciaturpunctata*. М – маркер 1 kb DNA ladder.

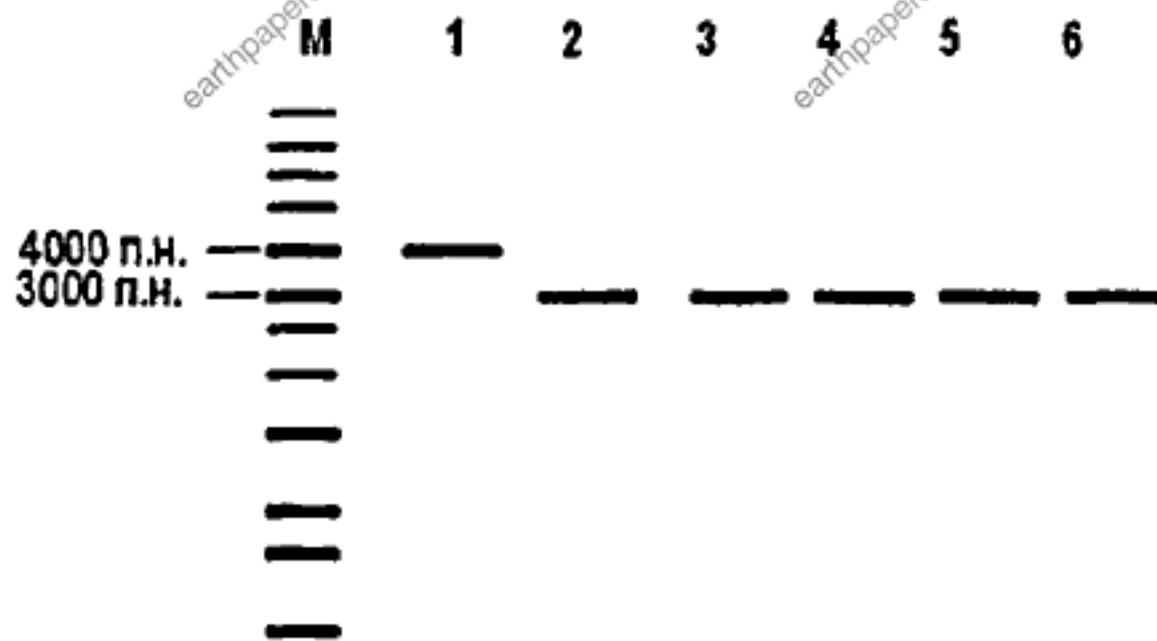


Рисунок 10. Схема электрофореза продуктов ПЦР (область ITS1, 5.8S, ITS2), полученных при амплификации рДНК божьих коровок : 1 - *Adalia bipunctata* (Тува), 2 – *Coccinella septempunctata* (Киргизия), 3 - *Coccinella septempunctata* (Москва), 4 - *Coccinella septempunctata* (Кавказ), 5 - *Coccinella septempunctata* (Кавказ), 6 - *Coccinella septempunctata* (Кавказ), М – маркер 1 kb DNA ladder.

ВЫВОДЫ

1. Доля переменных сайтов гена, кодирующего субъединицу I цитохромоксидазы при сравнении десяти видов жуков семейства Coccinellidae, составляет 40%. Данный участок характеризуется значительным накоплением мутаций в третьем положении кодонов (70% от количества переменных сайтов). Показано, что исследованные нуклеотидные последовательности мтДНК являются информативными для анализа филогенетических взаимоотношений на уровне видов и подсемейств.
2. Сравнение нуклеотидных последовательностей гена субъединицы I цитохромоксидазы позволяет выявить филогенетические связи десяти видов кокцинеллид (роды *Harmonia*, *Adalia*, *Coccinella*, *Semlaldalia*, *Hippodamia*, *Exochomus*, *Thea*).
3. Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей 3' - области гена, кодирующего субъединицу I цитохромоксидазы, у представителей *Adalia bipunctata* L., имеющих различную окраску переднеспинки и надкрылий, из географически удаленных популяций показал отсутствие различий видового уровня между *Adalia bipunctata fasciatopunctata* и *Adalia bipunctata bipunctata*.
4. Фрагмент рДНК, включающий транскрибируемые спейсеры, у разных представителей семейства Coccinellidae, различается по длине. Внутри вида не было выявлено различий. Таким образом, обнаружен внутривидовой генетический мономорфизм и сальтационный характер эволюции данных участков генома в семействе Coccinellidae.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ
ДИССЕРТАЦИИ

- 1) Паленко М. В., Муха Д. В., Захаров И. А. Изменчивость митохондриального гена цитохромоксидазы I внутри вида *Adalia bipunctata* и между видами жуков семейства Божьи коровки (Coleoptera: Coccinellidae) // Генетика. 2004. Т. 40. № 2. С. 205-209.
- 2) Паленко М. В., Муха Д. В., Захаров И. А. Филогения жуков семейства Coccinellidae на основе анализа нуклеотидной последовательности фрагмента гена, кодирующего субъединицу I цитохромоксидазы // Тезисы докладов 2-й конференции Московского общества генетиков и селекционеров им. Н. И. Вавилова "Актуальные проблемы генетики". Москва, 20-21 февраля 2003. С. 220-221.
- 3) Phylogeny of the Coccinellidae based on the mitochondrial cytochrome oxidase I sequence data. // Conference for young scientists, PhD students and students on molecular biology and genetics. Kyiv, Ukraine. September 25-27, 2003. P. 26.

earthpapers.net

earthpapers.net

earthpapers.net

earthpapers.net

earthpapers.net

earthpapers.net

earthpapers.net

earthpapers.net

earthpapers.net

Издательство ООО "МАКС Пресс".
Лицензия ИД № 00510 от 01.12.99 г.
Подписано к печати 26.08.2004 г.
Формат 60x90 1/16. Усл.печл. 1,5. Тираж 100 экз. Заказ 908.
Тел. 939-3890,939-3891,928-1042. Тел./факс 939-3891.
119992, ГСП-2, Москва,
Ленинские горы, МГУ им. М.В.Ломоносова.

earthpapers.net

earthpapers.net

earthpapers.net