

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК

Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова

На правах рукописи

УДК 575.13:579.23:591.33

РГБ ОД

18 ЯНВ 2000

Зинкевич Наталья Сергеевна

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

03.00.15 – генетика

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва

1999

Работа выполнена в лаборатории сравнительной генетики
животных Института общей генетики им. И.И. Вавилова РАН

Научный руководитель:

доктор биологических наук, профессор И.А. Захаров

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук М.И. Гордеев,

кандидат биологических наук А.М. Куликов

Ведущее учреждение: БиНИИ СПбГУ

Защита состоится «_____» _____ 2000 года в
_____ часов на заседании диссертационного совета Д002.49.01 при
Институте общей генетики им. И.И. Вавилова РАН (117809, ГСП-1,
Москва, В-333, ул. Губкина, 3, факс (095) 132-89-62)

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

Автореферат разослан «_____» _____ 1999 года

Ученый секретарь

диссертационного совета

кандидат биологических наук

Г.Н. Полухина

Е641.15,0
15.09.094.1000-4.0

1. Общая характеристика работы

1.1. **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 (1947), 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*.

1.2. 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 трансвариальной передачи бактерий в семьях *Adalia bipunctata* и *Harmonia axyridis*;
- определение стадии и морфологических проявлений гибели мужских эмбрионов *Adalia bipunctata* и *Harmonia axyridis*.

1.3. 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.

1.4. 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.

1.5. Апробация работы. Основные материалы работы доложены на семинаре кафедры эмбриологии биологического факультета МГУ (25 марта 1999 года), на Конференции молодых ученых и аспирантов ИОГен РАН и кафедры генетики и селекции биологического факультета МГУ (16 ноября 1999 года), представлены на 2-ой съезд ВОГиС (Санкт-Петербург, февраль 2000 г.).

1.6. Публикации. По теме диссертации опубликована 1 научная работа, находятся в печати 1 научная работа и тезисы в трудах 2-ого съезда ВОГиС.

1.7. 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.

2. Материалы и методы

Насекомые. Жуки *Harmonia axyridis* (Pall.) (Coccinellidae, Coleoptera) были собраны И.А. Захаровым на стадии имаго при лете на зимовку в 1997-1999 годах в Новосибирском Академгородке и в Кызыле (Республика Тыва). Популяции в районах, где осуществляли сбор хармоний, являлись практически мономорфными. Все жуки обладали фенотипом *axyridis*. В течение 4 месяцев жуки находились в холодильнике, при переносе их в условия лаборатории сразу же начиналась копуляция и откладка яиц.

Жуки *Adalia bipunctata* (L.) (Coccinellidae, Coleoptera) были отловлены в Санкт-Петербурге, в Ленинградской области (г. Гатчина, г. Кронштадт), в Москве и в Московской области (г. Дубна). В ряде экспериментов также были использованы лабораторные линии *A. bipunctata*: Ки3, И12, И22, Sp4, ПФ4.

Для выделения бессамцовых линий проводили учет вылупляемости личинок из яиц, отложенных самками в индивидуальных культурах. Если вылупляемость была не выше 50%, и это сопровождалось отсутствием значительного числа серых яиц, среди тех, из которых не вылупились личинки, то в случайной выборке определяли пол потомства. Пол жуков у *A. bipunctata* определяли на стадии имаго путем вскрытия, выявляя наличие сперматеки (у самок) или сифона (у самцов). Коровкам вида *H. axyridis* свойственен половой диморфизм: у самок голова черная с небольшим белым пятном на лбу, у самцов голова белая. В работе пол жуков определяли визуально, по окраске головы.

Исследования эмбриогенеза жуков в бессамцовых семьях проводили двумя методами. Для предварительного анализа картины эмбрионального развития яйца дехорионизировали при помощи хлоракса (10% водного раствора гипохлорита натрия). Затем эмбрионы отмывали в двух сменах физиологического раствора и помещали на покровное стекло в каплю вазелинового масла. Для микроскопирования и фотографирования препараты готовили по методу "висячей капли". В дальнейших исследованиях применяли фиксацию и окрашивание эмбрионов. Девителлинизацию и

фиксацию эмбрионов осуществляли по методу, предложенному Залокаром (Zalocar, 1971). Затем проводили окрашивание эмбрионов азур-эозином по Лилли (Lillie, 1954).

Для изучения морфологии овариол извлекали яичники из самок. Овариолы окрашивали нейтральным красным, препараты готовили по методу "висячей капли". Для обнаружения бактерий в яичниках делали мазки, которые фиксировали 96° этиловым спиртом и окрашивали метиленовой синькой. Просматривали препараты при увеличении $\times 90$ под иммерсией.

Препараты для электронно-микроскопического анализа готовили из материала овариол самок *A. bipunctata* и *H. axyridis* по методам, предложенным Уикли (Уикли, 1975). Срезы получали на ультратоме LKB, окрашивали по Рейнольдсу (Reynolds, 1963). Срезы просматривали в электронном микроскопе JEM-100CX при ускоряющем напряжении 80kV и инструментальном увеличении от 10000 до 60000.

Выделение ДНК из жуков *Harmonia axyridis* проводили по методу Д.В.Муха (Муха и др., 1995).

Идентификацию паразитических бактерий осуществляли методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с последующим секвенированием продуктов амплификации. Предварительное выявление бактериальных симбионтов проводили с помощью пары праймеров fD1 и rP1, которые амплифицируют участок генов 16S рибосомной РНК бактерий и позволяют получить характерный продукт длиной около 1400 п.н. Для идентификации бактерии, инфицирующей *Harmonia axyridis*, проводили полимеразную цепную реакцию, используя праймеры, специфичные для генов 16S рРНК бактерий класса *Mollicutes*, к которому относится и *Spiroplasma* (Hurst et al., 1996). Полимеразную цепную реакцию проводили на приборе Термоциклер PTC-100 (MJ Research, Inc., USA). Использовали термофильную ДНК-полимеразу из *Thermus aquaticus* (Taq-полимеразу) (Биоком, Москва). Реакцию проводили в объеме 40 мкл, используя так называемый "Hot Start".

Электрофорез продуктов амплификации проводили в 2% агарозном геле.

Определение последовательности нуклеотидов вели по методу Сенгера (Sanger et al., 1977).

Использованные в филогенетическом анализе последовательности генов 16S рРНК были получены из генного банка GenBank. Филогенетический анализ проводили с использованием пакета программ филогенетического анализа WET. Матрицы сходства были рассчитаны по методу Nei, Gojobori. Дендрограмма построена по методу "neighbor-joining".

Статистические методы. Флуктуирующая асимметрия (FA) билатеральных признаков вычислялась как: $(L-R)/(\frac{1}{2}(L+R))$, где L и R – левое и правое значение признака, соответственно (Palmer, Strobeck, 1986).

В других случаях использовались общепринятые статистические методы.

3. Результаты

3.1. Вторичное соотношение полов в новосибирской популяции *Harmonia axyridis*. Соотношение полов в семьях и выделение бессамцовых линий у собранных в природе жуков *Harmonia axyridis*.

Для определения вторичного соотношения полов (соотношения полов при вылуплении) определяли пол жуков, собранных в природе на стадии куколки и выведенных в лабораторных условиях. Нами был определен пол 214 особей из популяции Новосибирска. Процент самок в данной популяции составлял $63,1 \pm 3,3\%$. Соотношение полов было 135 самок : 79 самцов, что достоверно отличается от 1:1 ($\chi^2=14,65$ $P<0,001$).

От 18 самок, собранных в Новосибирске, и 16 самок, собранных в Кызыле было получено потомство. Учитывали выход личинок и определяли стадию, на которой прекращалось развитие яиц. Если яйца, из которых не вышли личинки были желтого цвета, то имела место ранняя эмбриональная гибель; если же яйца были серые, то - поздняя эмбриональная гибель. Пол имаго определяли визуально. Полученные результаты приведены в Табл.1.

Таблица 1. Развитие и пол потомства самок новосибирской (Novo) и кызыльской (Kyz) популяций *Harmonia axyridis*

Самка	Учтено кладок	Вылупилось личинок	Число неразвившихся яиц		Получено в потомстве	
			серых	желтых	самок	самцов
Novo 64	4	43	15	12	11	4
Novo 69	2	23	4	3	2	2
Novo 70	4	115	10	11	7	11
Novo 71	4	75	13	54	24	19
Novo 72	4	139	19	4	9	9
Novo73	4	162	17	8	9	7
Novo74	2	66	8	5	19	18
Novo75	4	124	7	8	15	18
Novo 101	5	47	37	24	24	0
Novo 102	-	-	-	-	6	2
Novo 103	4	89	21	31	6	7
Novo 105	3	33	4	4	4	6
Novo 106	3	56	31	23	7	5
Novo 107	-	-	-	-	4	3
Novo 108	3	16	4	43	16	0
Novo 111	3	100	11	11	12	7
Novo 112	3	60	16	11	7	9
Novo 115	3	59	4	2	10	7
Kyz 1	2	18	2	3	4	1
Kyz 2	3	63	7	6	2	4
Kyz 3	2	51	11	5	2	3
Kyz 4	1	25	1	1	2	1
Kyz 5	4	98	5	3	5	1
Kyz 6	1	22	15	4	5	0
Kyz 7	3	83	20	5	8	5
Kyz 9	4	78	9	3	4	7
Kyz 10	4	109	8	14	4	4
Kyz 11	4	79	18	10	5	3
Kyz 12	2	45	5	3	2	4
Kyz 13	5	48	10	37	5	2
Kyz 14	2	54	7	4	2	3
Kyz 15	3	36	30	22	9	0
Kyz 16	1	16	2	2	3	2
Kyz 18	3	48	1	5	4	1

Примечание к Табл. 1: значок '-' означает, что учет не проводился

Из 34 семей в 30 были получены и самцы, и самки, суммарное соотношение полов в этих обоеполых семьях - 181 самка : 158

самцов ($\chi^2=1,56 < 3,8$ различия от теоретически ожидаемого соотношения полов (1:1) не достоверны). В семье Novo101 в первых 5 кладках самцов не было, в 2 последующих самцы появились. Наконец, в семьях Novo 108 и Куз 15 самцов не было при достаточно большой численности потомства.

В потомстве самки Novo108 было изучено наследование признака бессамцовости (Табл.2). В четырех изученных поколениях в сумме от 7 самок было получено 117 потомков; все они оказались самками.

Таким образом, отклонение от нормального (1:1) соотношения полов в популяции *H. axyridis* обусловлено не дифференциальной выживаемостью самок на стадии личинки, а наличием в данной популяции самок, производящих исключительно женское потомство.

Таблица 2. Наследование признака бессамцовости в последовательных поколениях семьи Novo 108

Самка	Поколение потомства	Учте- но кладок	Вылу- пилось личинк	Число неразвившихся яиц		Получено в потомстве	
				серых	желтых	самок	самц
Novo 108	1	3	16	4	43	16	0
Novo 108-1	2	3	33	7	70	12	0
Novo 108-2	2	5	26	17	58	12	0
Novo 108-1-1	3	2	14	0	27	17	0
Novo 108-2-1	3	2	36	12	47	19	0
Novo 108-1- 1-2	4	4	61	12	62	41	0
Всего проана- лизировано:	4 поколе- ния	19	186	52	307	117	0

3.2. Соотношения полов в популяциях *Adalia bipunctata* и изменчивость числа овариол у самок

В 1996-1997 г. нами было изучено вторичное соотношение полов в популяциях Санкт-Петербурга, Москвы и Дубны и третичное в осенней генерации Москвы 1997 г. В 1999 г. в

популяциях Санкт-Петербурга и области нами было изучено как вторичное, так и третичное соотношение полов.

Наши данные для популяции Москвы 1996 г. соответствуют результатам, полученным ранее Я.Я.Лусом, который указывал, что процент самцов в этой популяции в разные годы составлял от 27,8% до 41,9%, а также данным И.А. Захарова, согласно которым в данной популяции 35-40% самцов (Лус, 1947; Захаров, 1995). В 1997 г. в популяции Москвы наблюдалось некоторое снижение доли самок (Табл.3).

Таблица 3. Доля самок в природных популяциях *Adalia bipunctata* Москвы, Дубны и Санкт-Петербурга и количество овариол у самок

Популяция	Год	Число самок в выборке	% самок в популяции	χ^2	Среднее число овариол	Флуктуирующая асимметрия числа овариол
Москва	1996	93	61,2±4,0	7,61; P<0,01	29,5±0,70	0,01002± 0,00274
Москва	1997	80	54,1±4,1	0,97*	28,6±0,47	0,01013± 0,00304
Дубна	1996	109	54,5±3,5	1,62*	30,1±0,68	0,00994± 0,00287
Дубна	1997	105	55,3±3,6	2,11*	29,8±0,54	0,01034± 0,00264
Санкт-Петербург	1996	94	74,0±3,9	29,29; P<0,001	27,6±0,40	0,02491± 0,00400

*- различия от теоретически ожидаемого (1:1) не достоверны

Соотношение полов в популяции Дубны было близким к нормальному соотношению полов (1:1) (Табл.3).

В популяции Санкт-Петербурга был обнаружен значительный и достоверный сдвиг в сторону преобладания самок (Табл. 3).

Популяции адалий Москвы и Санкт-Петербурга резко отличаются окраской элитр: в Москве преобладают красные, а в Санкт-Петербурге – черные особи (Сергиевский, Захаров, 1983; Захаров, 1992). Для того, чтобы выяснить, существует ли связь между различным фенотипическим составом популяций Москвы и

Санкт-Петербурга и сдвигом в соотношении полов в этих популяциях был исследован материал, собранный в Санкт-Петербурге и в двух городах Ленинградской области – Кронштадте и Гатчине, значительно отличающихся по доле черных особей от Санкт-Петербурга. Данные по сравнению процентного соотношения полов и доли меланистов в исследованных популяциях приводятся в Табл.4.

Таблица 4. Соотношение полов и доля меланистов в популяциях *Adalia bipunctata* Санкт-Петербурга, Гатчины и Кронштадта (1999 г.)

Популяция	% самок в выборке	% меланистов в выборке	Число особей в выборке и число особей, у которых был определен пол (в скобках)
Санкт-Петербург	68,3±2,3	70,9±2,2	422(417)
Кронштадт	71,0±5,8	54,8±6,3	62 (62)
Гатчина	69,1±3,1	41,0±3,3	227 (217)

Доля черных особей в популяциях Гатчины и Кронштадта значительно ниже, чем в Санкт-Петербурге, при этом доля самок в исследованных популяциях Ленинградской области остается столь же высокой, как и в Санкт-Петербурге (Табл. 4). Таким образом полиморфизм популяций адалий не связан со степенью инфицированности этих популяций андроцидными бактериями.

Нами было проведено изучение степени инфицированности самок природных популяций бактериями путем анализа окрашенных метиленовой синькой мазков яичников самок. Большие различия в инфицированности популяций Москвы и Санкт-Петербурга позволяют выяснить возможное влияние инфекции на плодовитость, оцениваемую числом овариол. Согласно полученным данным, среднее число овариол в популяциях Москвы достоверно выше среднего числа овариол в Санкт-Петербургской популяции. Также достоверно различались значения флуктуирующей асимметрии по числу овариол у самок из данных популяций – в выборке Санкт-

Санкт-Петербурга значение показателя асимметрии числа овариол выше, чем в выборке Москвы.

В Санкт-Петербургской популяции были исследованы две группы самок, в мазках одной группы были обнаружены бактериоподобные клетки, в мазках другой группы их не было обнаружено. Средние числа овариол в этих группах достоверно различались (у инфицированных самок овариол в яичниках было меньше, чем у неинфицированных). Для обеих групп Санкт-Петербурга были подсчитаны значения флуктуирующей асимметрии, которые также достоверно различались (у инфицированных самок значение показателя асимметрии было выше, чем у неинфицированных).

Давнюю историю имеет вопрос о приспособительной ценности красных и черных форм в популяциях (Лусис, 1961). Для Санкт-Петербургской популяции 1997 г. а также для популяций Санкт-Петербурга и Гатчины 1999 г. было проведено сравнение средних значений числа овариол у черных (меланистов) и красных (немеланистов) особей. Несмотря на то, что средние значения числа овариол у красных и черных особей достоверно не различаются, можно говорить о наличии тенденции увеличения числа овариол у красных особей, по сравнению с черными. Сравнительный анализ популяций Санкт-Петербурга и Гатчины 1999 г. показал, что средние значения числа овариол в этих популяциях достоверно не различаются, также достоверно не различаются показатели флуктуирующей асимметрии.

3.3. Развитие эмбрионов кокциnellид при заражении андроцидными бактериями

Из половины яиц *Adalia bipunctata* и *Harmonia axyridis*, полученных от самок-носительниц фактора бессамцовости, вылупления личинок не наблюдается (Лус, 19476; Захаров и др., 1996). Невылупившиеся эмбрионы предположительно являются самцами и гибнут в течение эмбриогенеза. У *Adalia bipunctata* невылупившиеся яйца во всех наблюдаемых нами кладках были желтого цвета, аналогичная картина наблюдалась для кладок самки Novo 108 *Harmonia axyridis* и ее потомства, в то время как в потомстве самки Novo 101 *Harmonia axyridis* и ее дочерей Novo 101-

1 и Novo 101-2 практически все невылупившиеся яйца были серого цвета. Таким образом, даже простые наблюдения за поведением яиц у *Harmonia axyridis* свидетельствуют о том, что остановка эмбрионального развития мужских эмбрионов может происходить на разных этапах эмбриогенеза.

На ранних стадиях эмбриогенеза не наблюдали отклонений в развитии эмбрионов. У *Adalia bipunctata* была обнаружена остановка развития у приблизительно 1/8 части эмбрионов в течение первых суток эмбриогенеза, в период 18-20 часов. В норме в этот период происходит обособление клеток бластодермы, и начинает формироваться зародышевая полоска, при нарушении эмбриогенеза обнаруживается остановка развития на стадии ранней бластодермы. У приблизительно 1/8 части эмбрионов остановка развития происходит во время появления головной и углубления вентральной борозд (25-30 часов). Приблизительно еще 1/8 часть эмбрионов останавливалась в развитии до окончания сегментации мезодермы (до 45-48 часов), у еще 1/8 части эмбрионов наблюдали остановку развития в период, когда начинается сегментация головы и туловища (до 50-55 часов).

Развитие эмбрионов *Harmonia axyridis*, полученных от самки Novo 108 и ее дочерей, обнаруживает закономерности, характерные для эмбрионов из бессамцовых семей адалии. На ранних этапах эмбриогенеза отклонений в развитии обнаружить не удалось. Примерно 1/8 эмбрионов претерпевала остановку развития на стадии формирования синцитиальной бластодермы (24-28 часов). Приблизительно еще 1/8 часть эмбрионов останавливалась в развитии на стадии ранней гаструлы (после 36-38 часов), еще 1/8 часть – в период, когда происходит сегментация мезодермы (после 60-65 часов) и 1/8 часть - во время сегментации головы и туловища (после 70-72 часов).

На стадии выхода личинок из куколок (примерно 72 ч. у *Adalia* и 96 - у *Harmonia*) видны морфологические аномалии эмбрионов, в различные периоды остановки развития, в которых процессы некроза представлены в разной степени.

В кладках, отложенных самкой *Harmonia axyridis* Novo 101, яйца, вылупления из которых не происходило, были серого цвета.

Микроскопический анализ показал, что на всем протяжении эмбриогенеза развитие большей части эмбрионов шло синхронно. Обычно единичные эмбрионы, но в некоторых кладках до 30%, не развивались вообще, половина эмбрионов развивалась нормально (в дальнейшем из них выходили самки), оставшаяся же часть продолжала развитие до формирования личиночных структур. После того как эти зародыши достигали стадии, предшествующей вылуплению, они так и оставались в яичевых оболочках.

В результате проведенных исследований было установлено, что для всех, использованных в эксперименте эмбрионов, полученных от бессамцовых самок *Adalia bipunctata* и самки *Harmonia axyridis* Novo 108 были идентифицированы, по крайней мере, четыре критические точки развития. Одна половина эмбрионов (женского пола) преодолевает все критические этапы развития и успешно достигает личиночной стадии, а позднее и стадии имаго. Для другой половины эмбрионов (очевидно, мужского пола) характерна остановка в развитии на том или ином критическом этапе развития с последующей некротизацией.

3.4. Микроскопическое изучение яичников инфицированных и неинфицированных самок кокцинелл

Взрослые самки божьих коровок имеют парные яичники с овариолами телотрофического типа (в телотрофических овариолах все питающие клетки (трофоциты) собраны в проксимальном отделе яичника в единую для всех ооцитов питающую камеру). Среднее число овариол в разных популяциях адалии в разные годы является стабильным и составляет 27-30 в обоих яичниках (Таблица 3). У репродуктивно активной самки каждая овариола состоит из гермария и фолликулов, у молодой самки, а также самки, пребывающей в состоянии имагинальной диапаузы, овариола состоит только из одного гермария.

Электроно-микроскопические исследования яичников кокцинелл выявили микроорганизмы различных типов. Были обнаружены микроорганизмы овальной формы в цитоплазме клеток гермария *Adalia bipunctata* из популяции Санкт-Петербурга. В ооците *Adalia bipunctata* обнаружены спиралевидные спироплазмоподобные микроорганизмы.

Ни в одном случае не обнаружено массовое бактериальное инфицирование фолликулов самок. В овариолах тех самок, у которых молекулярно-генетические исследования показали отсутствие бактерий, мы не обнаружили эндосимбионтов.

В английской линии SP4 методами электронной микроскопии выявлено обширное бактериальное заражение: в оогониальных клетках, ооцитах и клетках фолликулярного эпителия цитоплазма содержит большие количества бактериоподобных клеток. Наблюдаемые микроорганизмы по форме и размерам похожи на риккетсий. Цитоплазма инфицированных клеток была разрушена. В ядрах инфицированных клеток бактерии не были обнаружены.

3.5. Идентификация бактерии, вызывающей явление бессамцовости у *Harmonia axyridis*

Результаты анализа продуктов ПЦР, полученных при амплификации ДНК жуков *Harmonia axyridis*, представлены на рис.1. ДНК особи *H.axyridis* Novo 108 дала характерный амплифицированный фрагмент размером около 1400 п.н. (дорожка 3), что подтвердило присутствие бактериальной ДНК в тотальной ДНК, выделенной из жуков этой линии. После амплификации со специфичными для бактерий класса *Mollicutes* праймерами был получен продукт ПЦР размером около 429 п.н. у ДНК *H.axyridis* Novo 108 (дорожка 6), тогда как у ДНК самца *H.axyridis* Novo75 такого амплифицированного фрагмента обнаружено не было (дорожка 7).

Для сравнения мы провели ПЦР с ДНК *Adalia bipunctata* (№15 из Петербурга) с ранее обнаруженной в лаборатории *Spiroplasma* (Захаров и др., 1998), которая дала характерный амплифицированный фрагмент размером 429 п.н. (дорожка 8).

Амплифицированный в полимеразной цепной реакции фрагмент бактериального гена 16S рРНК был секвенирован. Была определена последовательность 362 нуклеотидов (рис.2), ее сравнили с данными генного банка (GenBank).

1 2 3 4 5 6 7 8

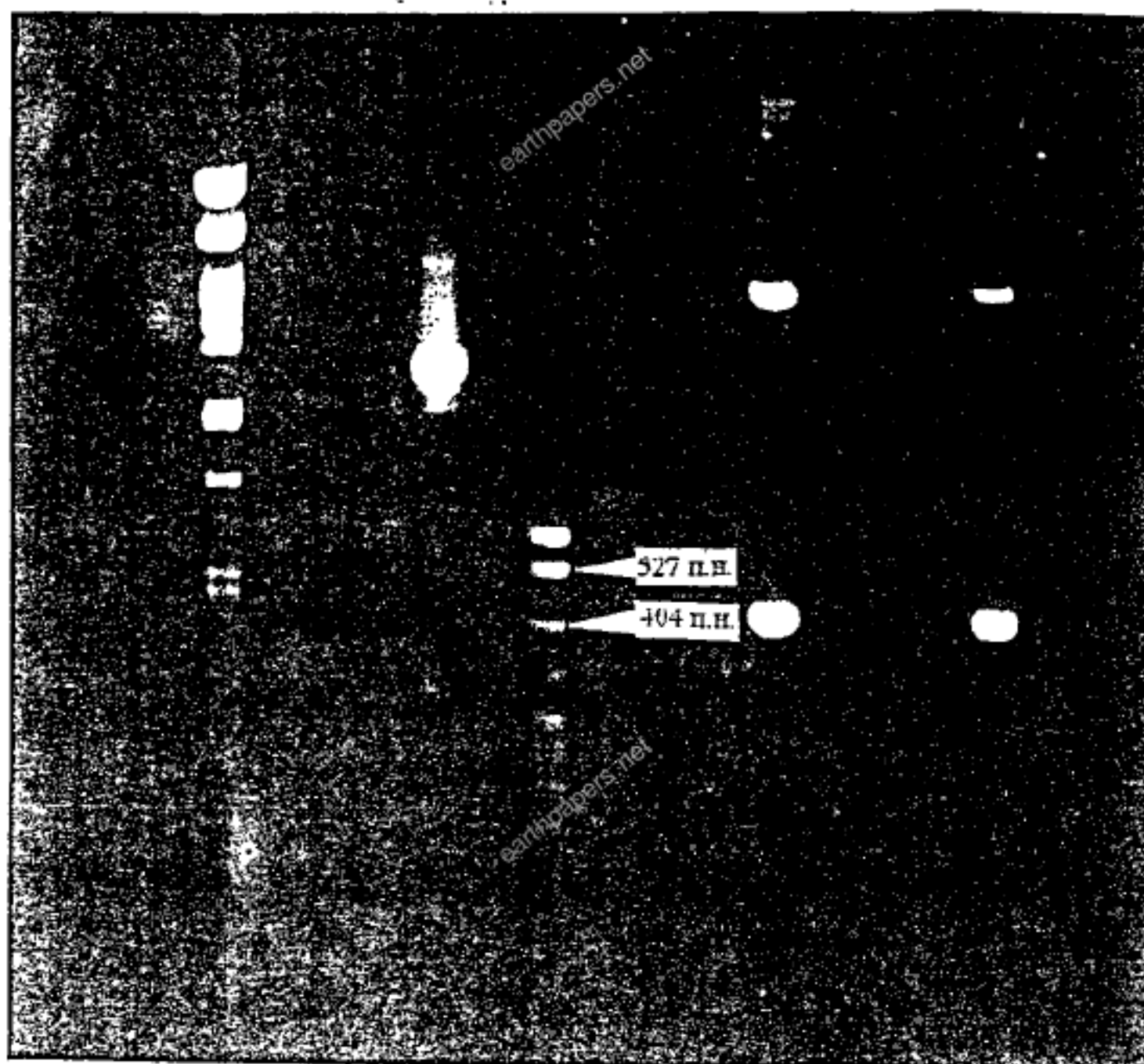


Рис.1. Выявление и идентификация бактериальной ДНК в тотальной ДНК, изолированной из жуков *H. axyridis*.

Электрофорез в 1,2% агарозном геле продуктов амплификации ДНК при использовании специфических ПЦР-праймеров.

Амплификация с праймерами, общими для большинства бактерий; дорожки:

- 1- маркер молекулярного веса – фрагменты ДНК фага λ после обработки рестриктазой Pst I
- 2- ПЦР-коктейль (компоненты ПЦР без ДНК)
- 3- ДНК *Harmonia axyridis* Novo 108

Амплификация с праймерами, специфичными к ДНК бактерий класса *Mollicutes* (*Spiroplasma*); дорожки:

- 4- маркер молекулярного веса – фрагменты ДНК плазмиды pBR322 после обработки рестриктазой Msp I
- 5- ПЦР-коктейль (компоненты ПЦР без ДНК)
- 6- ДНК *Harmonia axyridis* Novo 108
- 7- ДНК *Harmonia axyridis* Novo 75 (самец)
- 8- ДНК *Adalia bipunctata* со *Spiroplasma*

362 п.н.; 106 А; 70 С; 104 G; 81 Т; 1 неизвестен,
 CTACATTACT AGAGTATAGG AGAGGTTAGT GGAATTTTCAT
 GTGTAGCGGT GGAATGCGTA GATATATGAA GGAACACCAG
 TGGCGAAGGC GGCTAACTGG CCTATTACTG ACGTTGTGGC
 ACGAAAGCGT GGGGAGCAAA TAGGATTAGA TACCCTAGTA
 GTCCACGCCG TAAACGATGA GТАCTAAGTG TTGCCATGAG
 GCAGTGCTGT AGCTAACGCA TТАAGTACTC CGCCTGAGTA
 GTATGCTCGC AAGAGTGAAA СТCAAAGGAA TTGACGGGGA
 CCCGCACAAG CGGTGGAGCA TGTGGTTTAA TTCGAAGCAA
 CGCGAAGAAC СТТАCCAGGT СТTGACATAC СТTGСNAAGC ТА

Рис. 2. Нуклеотидная последовательность амплифицированного фрагмента гена 16S рРНК бактерий-симбионтов линии Novo 108 *Harmonia axyridis*

Полученная последовательность полностью совпала с соответствующим фрагментом гена 16S рРНК *Spiroplasma* группы VI (Tully et al., 1995).

До недавнего времени в классе *Mollicutes* была известна только одна бактерия, вызывающая явление бессамцовости. Это *Spiroplasma* группы II (типичная линия - DW-1), выделенная из *Drosophila willistoni*. Филогенетически спироплазма дрозофилы связана с кластером, типичным представителем которого является *Spiroplasma citri*. Спироплазма, выделенная нами из божьей коровки *Harmonia axyridis*, филогенетически не связана со спироплазмой дрозофилы и кластеризуется с спироплазмой, выделенной из иксодовых клещей (см. рис.3).

Согласно классификации, выполненной Вейсбургом (Weissburg et al., 1989) спироплазма иксодовых клещей, линия Y-32, образует отдельный кластер. Дендрограмма, представляющая филогенетические связи исследуемой бактерии, выполненная на основании результатов настоящей работы, в целом совпадает с дендрограммой, построенной ранее Вейсбургом. Спироплазма, выделенная из *H. axyridis* и ранее выделенная в нашей лаборатории спироплазма из *A. bipunctata* образуют кластер с линией Y-32, причем этот кластер значительно отличается от других кластеров, представленных на дендрограмме (рис.3).

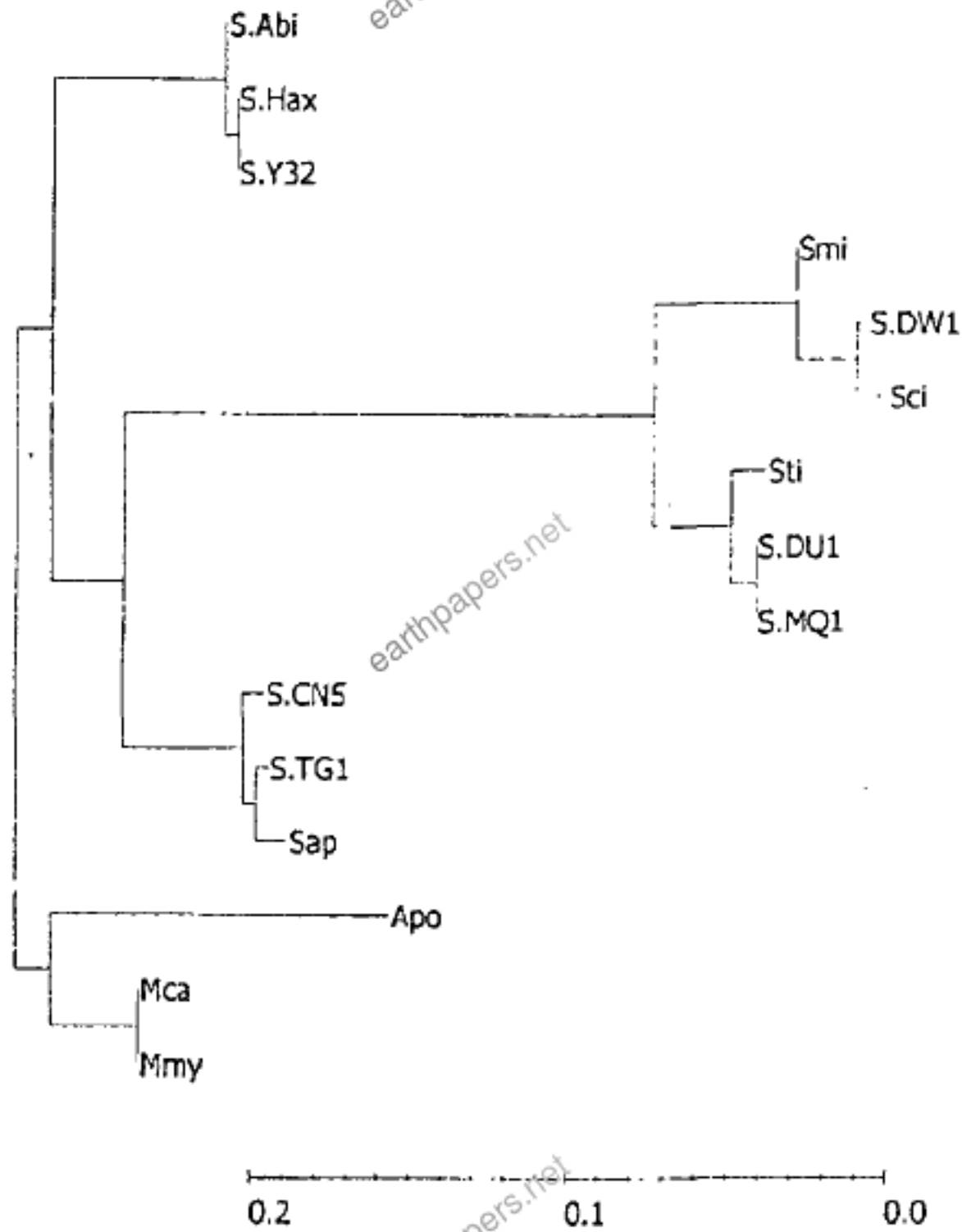


Рис. 3. Филогенетическое дерево, представляющее положение бактерии *Spiroplasma*, выделенной из *H. axyridis*. Дендрограмма построена методом *neighbor-joining*, дистанции рассчитаны по методу *Nei, Gojobori*. Обозначения бактерий: Mca - *Mycoplasma capricolum*, Mmy - *Mycoplasma mycoides*, S.Hax - спироплазма, выделенная из *H. axyridis* (линия Novo 108), S.Abi - спироплазма, выделенная из *A. bipunctata*, S.Y32 - *Spiroplasma* VI группы (типовая линия Y-32), S.TG1 - *Spiroplasma* XXIII группы (типовая линия TG-1), S.MQ1 - *Spiroplasma* VII группы (типовая линия MQ-1), S.DW1 - *Spiroplasma* II группы (типовая линия - DW-1), S.Sci - *Spiroplasma citri*, S.CN5 - *Spiroplasma* IX группы (типовая линия CN-5), Sap - *Spiroplasma apis*, SDU1 - *Spiroplasma* XII группы (типовая линия - DU-1), S.Sti - *Spiroplasma taiwanense*, S.Smi - *Spiroplasma mirum*, Apo - *Acholeplasma polakii*

Результаты филогенетического анализа являются неожиданными, поскольку более логичным было бы предположить наличие родственных связей между спироплазмой, вызывающей явление бессамцовости у представителей рода *Drosophila* и спироплазмой, выделенной из *Harmonia axyridis*. Кроме того, известно, что иксодовые клещи являются паразитами теплокровных, и вряд ли могли инфицировать кокциnellид.

Обсуждение

В ходе работы установлено, что вторичное соотношение полов в изученной природной популяции *Harmonia axyridis*, собранной в Академгородке под Новосибирском, достоверно отличалось от (1:1) и было сдвинуто в сторону преобладания самок. Результаты анализа вторичных половых соотношений в отдельных семьях с обоеполым потомством, выделенных из популяций *H. axyridis*, соответствовали ожидаемому отношению 1:1 (суммарная доля самцов составляла 50,5%), поскольку известно, что у кокциnellид имеет место хромосомный механизм определения пола, при котором самки имеют две X-хромосомы, самцы X- и Y- хромосому (Луаринова et al., 1984).

Электронно-микроскопические исследования яичников самок, зараженных бактериями рода *Spiroplasma*, не выявили серьезных нарушений как в гермариальной, так и в фолликулярной частях овариол. Несмотря на то, что было просмотрено более 500 ультратонких срезов овариол от 22 самок *A. bipunctata* и 12 самок *H. axyridis* (от каждой особи получали 10-30 срезов), места локализации бактериоподобных организмов наблюдали редко, были обнаружены либо одиночные спироплазмоподобные клетки, либо их небольшие скопления.

Результаты электронно-микроскопического анализа свидетельствуют о том, что различные бактерии, вызывающие один и тот же эффект (гибель мужских эмбрионов), по-разному влияют на состояние овариол инфицированных самок. Как уже отмечалось, у линии адалий из английской популяции в цитоплазме клеток фолликулярного эпителия яичников и в цитоплазме ооцитов (ооплазме) было обнаружено большое количество риккетсиноподобных организмов. Картины бактериального

заражения и состояние цитоплазмы инфицированных клеток свидетельствовали о сильном цитопатогенном эффекте данных микроорганизмов. Между тем, у самок *A. bipunctata* и *H. axyridis*, зараженных, согласно результатам ПЦР, спироплазмой, мы не наблюдали больших количеств бактериальных клеток.

Эмбриологические исследования показали, что как у адалии, так и у хармонии не наблюдается остановки развития на самых ранних этапах эмбриогенеза, то есть фактор бессамцовости не препятствует началу дробления яйцеклетки. Для обеих кокциinelлид была показана остановка развития части эмбрионов на стадии формирования синцитиальной бластодермы. Также наблюдались эмбрионы, у которых остановка развития происходила на различных стадиях органогенеза. Заслуживает внимания тот факт, что для хармонии, по крайней мере семьи Novo 101, наблюдалась остановка развития эмбрионов на стадии, предшествующей вылуплению. Возможно, накопление бактерий, вызывающих бессамцовость, или их продуктов приводит в данном случае к формированию мышечной дистрофии, и личинка не может разорвать оболочки яйца, чтобы выйти наружу.

В развитии *Adalia bipunctata* и *Harmonia axyridis* имеются особые чувствительные или критические периоды, в течение которых происходит гибель мужских эмбрионов, зараженных андроцидными бактериями. В результате проведенных исследований нами были установлены четыре критических периода развития для эмбрионов *A. bipunctata* и *H. axyridis* Novo108, на каждом из которых наблюдали гибель примерно 1/8 части эмбрионов. На этих критических этапах происходила остановка развития, затем следовало разрушение тканей эмбриона и, в конце концов, некроз. Половина эмбрионов преодолевала все критические периоды и успешно вылуплялась. У остальных эмбрионов наблюдалась остановка развития на различных стадиях, подобно тому, как это происходит в линиях *Drosophila* с цитоплазматической несовместимостью, вызванной бактерией рода *Wolbachia* и с отклонением от нормального соотношения полов, вызванным бактерией рода *Spiroplasma* (Tsuchiyama-Omura et al., 1988; Callaini et al., 1996).

Выводы

1. Вторичное соотношение полов в новосибирской популяции *Harmonia axyridis* достоверно сдвинуто в сторону преобладания самок. В данной популяции обнаружены самки, в потомстве которых отсутствуют самцы.

2. Бессамцовость в сибирских популяциях *Harmonia axyridis* определяется действием цитоплазматически наследуемой симбиотической бактерии, принадлежащей к порядку *Mycoplasmatales*, роду *Spiroplasma*.

3. Спироплазма, выделенная из *Harmonia axyridis*, филогенетически близка к спироплазме, вызывающей явление бессамцовости у *Adalia bipunctata*, и к *Spiroplasma ixodetis* линии Y-32, обнаруженной у иксодового клеща *Ixodes pacificus*.

4. Гибель мужских зародышей у *Adalia bipunctata* и *Harmonia axyridis* Novo 108 наблюдается после образования полярных клеток (начала половой детерминации), на различных стадиях эмбриогенеза, во время которых происходит: 1) переход от синцитиальной к клеточной бластодерме, 2) появление вентральной и головной борозд, 3) сегментация мезодермы, 4) сегментация головы и туловища. На каждой стадии гибнет приблизительно 1/8 часть от общего числа эмбрионов.

5. Клетки фолликулярного эпителия адалий английской линии Sp4 заражены большим количеством бактериальных эндосимбионтов (риккетсий). Цитоплазма клеток при этом показывает признаки повреждения, ядро остается неповрежденным и свободным от бактерий. В изученных нами линиях *Adalia bipunctata* и *Harmonia axyridis*, инфицированных бактериями рода *Spiroplasma*, в цитоплазме ооцитов и клеток фолликулярного эпителия обнаружены немногочисленные бактериоподобные организмы, при этом цитоплазма оставалась неповрежденной.

Список работ, опубликованных по материалам диссертации

1. Захаров И.А., Зинкевич Н.С., Шайкевич Е.В., Высоцкая Л.В., Доржу Ч.М., Межерес М.Е.Н. Соотношение полов и явление бессамцовости в сибирских популяциях *Harmonia axyridis* (Pall.) // Генетика. 1999. Т. 35. № 6. С. 771-776.

2. Зинкевич Н. С., Темкина Л. М., Соколова М. И. Особенности эмбриогенеза и оогенеза жуков *Adalia bipunctata* L. и *Harmonia axyridis* Pall. в бессамцовых семьях. // Онтогенез. 2000. Т. 31.