

<https://doi.org/10.17816/ecogen17437-45>

ЭКОЛОГИЧЕСКАЯ ГЕНЕТИКА ЖУКОВ РОДА *ADALIA*: ИЗМЕНЧИВОСТЬ И СИМБИОТИЧЕСКИЕ БАКТЕРИИ В ЕВРОПЕЙСКИХ ПОПУЛЯЦИЯХ ДЕСЯТИТОЧЕЧНОЙ БОЖЬЕЙ КОРОВКИ *ADALIA DECEMPUNCTATA*

© Е.В. Шайкевич¹, И.А. Захаров¹, А. Хонек²¹ ФГБУН «Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова» РАН, Москва, Россия;² Научно-исследовательский институт изучения сельскохозяйственных культур, Прага-Ружиче, Чехия

Для цитирования: Шайкевич Е.В., Захаров И.А., Хонек А. Экологическая генетика жуков рода *Adalia*: изменчивость и симбиотические бактерии в европейских популяциях десятиточечной божьей коровки *Adalia decempunctata* // Экологическая генетика. – 2019. – Т. 17. – № 4. – С. 37–45. <https://doi.org/10.17816/ecogen17437-45>.

Поступила: 04.06.2019

Одобрена: 29.10.2019

Принята: 17.12.2019

☼ **Цель.** Задачей настоящей работы было изучить изменчивость ДНК десятиточечных божьих коровок *Adalia decempunctata* L. (Coleoptera: Coccinellidae) из девяти городов Европы и филогенетические связи их симбиотических бактерий. **Методы.** Исследовали полиморфизм гена *COI* митохондриальной ДНК и зараженность *Wolbachia*, *Spiroplasma* и *Rickettsia* методом ПЦР и секвенированием. **Результаты.** Восемь гаплотипов гена *COI* мтДНК, семь из которых до этого не были известны, обнаружены у 92 особей *A. decempunctata* из девяти мест сбора в Европейской части ареала, а именно: из Праги, Рима, Флоренции, Гамбурга, Парижа, Стокгольма, Москвы, Феодосии и Ялты. *A. decempunctata* менее изменчивы по мтДНК по сравнению с двучечной *A. bipunctata*. Симбиотические бактерии *Wolbachia* и *Spiroplasma* в изученных *A. decempunctata* не выявлены. Зараженность *Rickettsia* обнаружена у *A. decempunctata* в Стокгольме и Феодосии. Проведено сравнение симбионтов *A. decempunctata*, *A. bipunctata* и семиточечной *Coccinella* sp. ДНК бактерии *Rickettsia* из *A. decempunctata* из Феодосии и Стокгольма по гену *gltA* различаются на 0,5 % и один из вариантов идентичен симбионту *A. bipunctata* и *Coccinella* sp. **Выводы.** Три гаплотипа мтДНК присутствуют в генофонде *A. decempunctata*, собранных в географически далеких местах обитания. Количество нуклеотидных замен между *Rickettsia* из *A. decempunctata* и *A. bipunctata* позволяет предполагать единое происхождение симбионта у божьих коровок рода *Adalia*, полученные результаты не исключают последующих горизонтальных переносов *Rickettsia* между особями обоих видов.

☼ **Ключевые слова:** божьи коровки *Adalia*; полиморфизм ДНК; эндосимбиотические бактерии.

ECOLOGICAL GENETICS OF *ADALIA* BEETLES: VARIABILITY AND SYMBIOTIC BACTERIA IN EUROPEAN POPULATIONS OF THE TEN-SPOT LADYBIRD BEETLE *ADALIA DECEMPUNCTATA*

© E.V. Shaikevich¹, I.A. Zakharov¹, A. Honek²¹ Vavilov Institute of General genetics, Moscow, Russia;² Crop Research Institute, Prague-Ruzyně, Czech Republic

Cite this article as: Shaikevich EV, Zakharov IA, Honek A.

Ecological genetics of *Adalia* beetles: variability and symbiotic bacteria in european populations of the ten-spot ladybird beetle *Adalia decempunctata*.Ecological genetics. 2019;17(4):37-45. <https://doi.org/10.17816/ecogen17437-45>.

Received: 04.06.2019

Revised: 29.10.2019

Accepted: 17.12.2019

☼ **Background.** *Adalia decempunctata* L. (Coleoptera: Coccinellidae) — ten-spot ladybird beetle, widespread morphologically variable Palearctic species. **Materials and methods.** DNA polymorphism and infection with *Wolbachia*, *Spiroplasma* and *Rickettsia* symbiotic bacteria were investigated. **Results.** Eight different haplotypes of the mitochondrial *COI* gene, seven of which were previously unknown, were found in 92 *A. decempunctata* individuals from nine European collection places: Prague, Rome, Florence, Hamburg, Paris, Stockholm, Moscow, Feodosia and Yalta. *A. decempunctata* is less variable in mtDNA compared to *A. bipunctata*. Symbiotic bacteria *Wolbachia* and *Spiroplasma* were not detected. Only *Rickettsia* infestation was found in *A. decempunctata* specimens, gathered in Stockholm and Feodosia. *Rickettsia* from *A. decempunctata* from Feodosia and Stockholm differ by 0.5% in *gltA* gene. *Rickettsia* from *A. decempunctata* from Feodosia is clustered with *Rickettsia* from *A. bipunctata* and *Coccinella* sp. based on the analysis of the *gltA* gene. **Conclusion:** Three of the eight mtDNA haplotypes are present in the *A. decempunctata* gene pool from geographically distant habitats. A small amount of nucleotide substitutions between *Rickettsia* from *A. decempunctata* and *A. bipunctata* suggests a single origin of the symbiont in the ladybirds of the genus *Adalia*, the results do not exclude subsequent horizontal transfers between individuals of both species.

☼ **Keywords:** *Adalia* ladybirds; DNA variability; endosymbiotic bacteria.

ВВЕДЕНИЕ

Adalia decempunctata Linnaeus, 1758 — божья коровка с десятью точками на надкрыльях у типичной формы, широко распространенный палеарктический вид, встречающийся в Европе от Скандинавии до Италии и от Португалии до Урала. Самая восточная точка, где были встречены божьи коровки этого вида, — Екатеринбург. Достоверных сведений о нахождении этого вида восточнее Урала не имеется.

Божьи коровки рода *Adalia*, включая *A. decempunctata*, принадлежат к числу наиболее изменчивых по морфологическим признакам родам кокциnellид [1–3]. Исследования близкородственного к *A. decempunctata*, высоко изменчивого вида *Adalia bipunctata* Linnaeus, 1758, показали значительный полиморфизм этого вида не только по морфологии, но и по митохондриальной ДНК [4–7]. У *A. bipunctata* было обнаружено 18 митохондриальных гаплотипов [5, 6]. Митохондриальный полиморфизм *A. decempunctata* ранее изучен не был.

Более 60 % видов насекомых заражены симбиотическими бактериями, часто нарушающими репродукцию хозяев [8]. У божьих коровок симбионты вызывают андроксид — смерть потомства мужского пола и, соответственно, сдвиг в соотношении полов потомства в сторону самок [9]. Божьи коровки семейства Coccinellidae особенно подвержены заражению симбиотическими бактериями, 13 из 30 изученных европейских видов божьих коровок заражены бактериальными симбионтами родов *Wolbachia*, *Spiroplasma* и *Rickettsia* [9]. Бактерии передаются потомству трансвариально, с цитоплазмой матери, что обуславливает совместное наследование и распространение митохондриальной ДНК и симбионта. При изучении двухточечной *A. bipunctata* была показана сцепленность определенных гаплотипов мтДНК с зараженностью *Rickettsia* или *Spiroplasma* [4, 6]. Инфицирование *Rickettsia* было обнаружено и у *A. decempunctata* из Германии [10], Швеции [11] и Великобритании [12], *Wolbachia* и *Spiroplasma* у этого вида обнаружены не были [10–12].

Задачей настоящей работы было описать полиморфизм ДНК в популяциях *A. decempunctata* из девяти городов Европы, выяснить существуют ли какие-либо закономерности в географическом распространении митохондриальных гаплотипов *A. decempunctata* и определить частоту заражения, разнообразие и филогенетические связи симбиотических бактерий у *A. decempunctata*, а также сравнить генетическую изменчивость и разнообразие по морфологическим признакам у *A. decempunctata* и близкого вида — *A. bipunctata*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Божьи коровки были собраны в Москве, Праге, Париже, Флоренции, Риме и Гамбурге в 2012 и 2015 гг., в Феодосии и Ялте в 2017 г. Полиморфизм мтДНК

и *Rickettsia* исследовали у *A. decempunctata* из Швеции, зараженность симбионтами которых проверена ранее [11]. Жуки были определены до вида по морфологическим признакам — по рисунку надкрылий и переднеспинки [2]. 199 жуков *A. decempunctata* проверили на зараженность симбиотическими бактериями и секвенировали ДНК гена *COI* для 92 особей. Две особи *Coccinella* sp., симпатрически живших с *A. decempunctata* в г. Кемь (Карелия), также исследовали по маркерам мтДНК и бактериальной ДНК. Определили последовательности бактерий из жуков двухточечной божьей коровки *A. bipunctata*, собранных в 2015 г. в Бурятии и Карелии. *A. bipunctata* (84 особи), собранные в июне 2009 г. в Санкт-Петербурге, описаны ранее [6, 7] и использовались для сравнения с *A. decempunctata* (116 особей из Праги) по полиморфизму окраски и митохондриальной ДНК.

Выделение ДНК проводили из сухих или заспиртованных имаго с помощью набора DIALom™ DNA Prep Kit (Изоген, Москва). Зараженность бактериальными симбионтами проверяли с помощью ПЦР со специфическими праймерами к гену малой субъединицы 16S рРНК *Spiroplasma* [13], к гену *gltA Rickettsia* [10], к гену белка оболочки *wsp Wolbachia* [14]. Полиморфный участок гена цитохромоксидазы субъединицы I (*COI*) мтДНК амплифицировали с помощью праймеров C1-j-1951 и C1-N-2618 [4]. Участок рибосомного кластера генов рРНК — второй внутренний транскрибируемый спейсер (ITS2), амплифицировали с праймерами 5,8S и 28S rRNA [15]. ПРЦ-продукты выделяли из агарозного геля с помощью набора Clean up (Евроген, Россия). Секвенировали фрагменты ДНК с прямого и обратного праймеров на секвенаторе ABI 310 с использованием ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Вновь полученные различающиеся митохондриальные гаплотипы зарегистрированы в Генбанке под номерами KJ645081-KJ645085 и MK932842-MK932845, последовательности локуса *ITS2* — KJ645086-KJ645094, гена цитратсинтазы *Rickettsia* — MK932846-MK932850.

Анализ данных проводили с использованием программы MEGA6 [16] и DnaSP v5 [17]. Дендрограмма сходства последовательностей ДНК гена *gltA Rickettsia* построена методом максимального правдоподобия, с использованием модели Tamura-Nei и 1000 бутстреп-итераций в программе MEGA6 [16]. Сеть гаплотипов мтДНК построена в программе NETWORK ver. 4.6.1.6 [18]. Значения эволюционной дивергенции между анализируемыми митохондриальными гаплотипами вычисляли как среднее число нуклеотидных замен между двумя сравниваемыми последовательностями в пересчете на один сайт. Внутрипопуляционное разнообразие определяли по Животовскому (1980), по среднему числу морф (μ), этот же показатель μ использован для определения разнообразия по митохондриальным

гаплотипам [19]. Доверительный интервал (в процентах) при анализе встречаемости симбионтов в выборках рассчитывали для выборок десяти и более особей по методу Клоппера – Пирсона, как было опубликовано [20–22].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Полиморфизм ДНК *A. decempunctata*

92 последовательности ДНК митохондриального гена *COI* размером 616 п. н. были определены при изучении генетической изменчивости популяций *A. decempunctata* из девяти мест сбора (табл. 1). Обнаружены восемь митохондриальных гаплотипов, различающихся в девяти вариабельных сайтах. Все мутации относятся к транзициям А-Г или С-Т и синонимичны.

Три митохондриальных гаплотипа обнаружены в двух и более местах сборов. Гаплотип Н1 обнаружен нами во всех девяти популяциях у 68 (74 % от всех изученных) особей (табл. 1), и на сети гаплотипов именно данный вариант является предковым (корневым) для всех остальных митохондриальных типов *A. decempunctata* (рис. 1). Все обнаруженные гаплотипы связаны между собой одной или двумя последовательными мутациями (рис. 1). Два гипотетических митохондриальных гаплотипа, между Н6 и Н2 и между Н1 и Н8, не встретились в исследованных образцах. Значения эволюционной дивергенции между анализируемыми митохондриальными гаплотипами не превышают 0,8 %, что соответствует уровню внутривидовых различий.

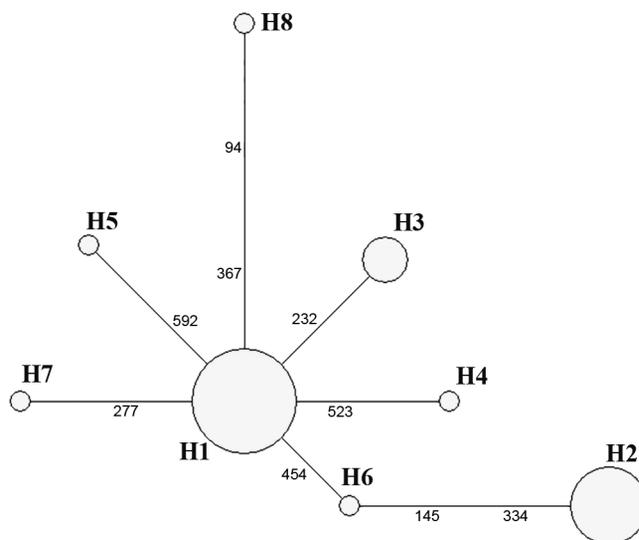


Рис. 1. Внутривидовой полиморфизм гаплотипов мтДНК *A. decempunctata*. Восемь гаплотипов представлены на сети пропорционально их встречаемости в выборке

Результаты анализа генетического разнообразия *A. decempunctata* на основе последовательности гена *COI* мтДНК обобщены в табл. 2. Уровни гаплотипического разнообразия в сборах из Праги и Флоренции выше, чем в общей выборке. В трех местах сборов, в Париже, Феодосии и Ялте, число изученных особей мало и обнаружен только гаплотип Н1. Результаты тестов Tajima’s D и Fu’s Fs статистически

Таблица 1

Место и год сбора исследованных *A. decempunctata*, число особей с различными гаплотипами мтДНК по гену *COI*

Популяция	Место сбора	Год	Число особей	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8
Чехия, Прага	Ружине, территория института (50°09' N 14°30' E)	2012	29	19	7	2	1	0	0	0	0
Франция, Париж	Близ станции метро Сите (48°51' N 2°20' E)	2012	3	3	0	0	0	0	0	0	0
Россия, Москва	Парк Нескучный сад (55°43' N 37°35' E)	2015	10	8	1	0	0	0	1	0	0
Италия, Рим	Монте Пинчио (41°91' N 12°48' N)	2015	20	18	0	0	0	0	0	1	1
Италия, Флоренция	Парко дел Анконелла (43°76' N 11°30' E)	2015	9	3	5	0	0	1	0	0	0
Германия, Гамбург	Данцигер штрассе (53°56' N 10°01' E)	2015	6	5	1	0	0	0	0	0	0
Швеция, Стокгольм	Район Кунгенс Kurva (59°16' N 17°54' E)	2001	5	2	0	3	0	0	0	0	0
Россия, Феодосия	Набережная (45°01'44.3" N 35°22'38.7" E)	2017	5	5	0	0	0	0	0	0	0
Россия, Ялта	Набережная (44°29'14.7" N 34°09'37.9" E)	2017	5	5	0	0	0	0	0	0	0
Всего			92	68	14	5	1	1	1	1	1

Таблица 2

Генетическое разнообразие популяций *A. decempunctata* на основе анализа гена *COI*

Популяция	H	Hd	K	Pi	Tajima's D	Fu's Fs statistic
Чехия, Прага	4	0,52463	1,3399	0,00218	0,40983	1,970
Франция, Париж	1	0	0	0	—	—
Россия, Москва	3	0,37778	0,75556	0,00123	-1,03446	-0,046
Италия, Рим	3	0,19474	0,3	0,00049	-1,72331	-1,143
Италия, Флоренция	3	0,63889	1,88889	0,00308	1,15206	1,658
Германия, Гамбург	2	0,33333	1	0,00163	-1,23311	1,609
Швеция, Стокгольм	2	0,6	0,6	0,00098	1,22474	0,626
Россия, Феодосия	1	0	0	0	—	—
Россия, Ялта	1	0	0	0	—	—
Всего	8	0,43168	1,01027	0,00164	-1,08219	-2,116

Примечание. H — число гаплотипов; Hd — гаплотипическое разнообразие; K — среднее число нуклеотидных различий; Pi — нуклеотидное разнообразие (PiJC); Tajima's D и Fu's Fs — тесты на нейтральность (статистически не достоверны, $p > 0,05$).

Таблица 3

Показатели внутривидового разнообразия *A. decempunctata* и *A. bipunctata*

Вид, популяция	Число особей	Среднее число морф (рисунок на надкрыльях), μ	Среднее число гаплотипов мтДНК, μ	Внутривидовое разнообразие мтДНК, Hd
<i>A. decempunctata</i> , Прага	116	$2,850 \pm 0,055$	$3,362 \pm 0,408$	$0,556 \pm 0,086$
<i>A. bipunctata</i> , Санкт-Петербург	84	$3,010 \pm 0,127$	$9,290 \pm 1,007$	$0,749 \pm 0,079$

не достоверны (табл. 2) и свидетельствуют, что обнаруженные мутации носят нейтральный характер. Параметры генетического разнообразия показывают, что в целом в популяции *A. decempunctata* Европы сохраняется довольно высокий уровень гаплотипического разнообразия при низком уровне нуклеотидной изменчивости (табл. 2).

Для контроля изменчивости ядерной ДНК в географически удаленных популяциях были исследованы последовательности области ITS2 кластера рибосомных генов рРНК. Размер изученной области с прилегающими участками генов 5,8S и 28S рРНК составил 900 п. н. Нуклеотидные последовательности ITS2 у всех особей оказались идентичными.

Изменчивость окраски (морфологический полиморфизм)

В наиболее многочисленной из изученных — локальной популяции *A. decempunctata* из Праги (116 особей) — были обнаружены три морфы: *bimaculata*, *decempustulata*, *typica*, различающиеся рисунком на надкрыльях, с численностью 23, 74 и 44 особи соответственно. Среди популяций *A. bipunctata* петербургская выделяется очень высоким содержанием форм-меланистов [6]. Проведенное исследование позволило сопоставить уровни внутривидовой измен-

чивости мтДНК и морфологических признаков у двух близких видов — *A. decempunctata* и *A. bipunctata*. *A. bipunctata* оказалась более изменчивой по разнообразию мтДНК (табл. 3).

Симбионты *A. decempunctata* и других божьих коровок

Мы проверили на зараженность *Rickettsia*, а затем *Wolbachia* и *Spiroplasma* 116 особей *A. decempunctata* из Праги, 24 — из Москвы, 20 — из Рима, 10 — из Флоренции, 6 — из Гамбурга, 3 — из Парижа, 12 — из Феодосии и 8 — из Ялты. Из 199 проверенных *A. decempunctata*, собранных в 2012, 2015 и 2017 гг., в восьми европейских локальных популяциях только одна особь из Феодосии оказалась заражена *Rickettsia*. В анализ добавлены данные по зараженности 18 особей *A. decempunctata* из Стокгольма (табл. 4). Ни в одном из сборов *A. decempunctata* не были обнаружены ни *Wolbachia*, ни *Spiroplasma*. Амплификация локуса *COI* мтДНК служила контролем качества ДНК, в качестве положительных контролей использовалась ДНК *A. decempunctata* и *A. bipunctata*, зараженных симбионтами. Доверительный интервал позволяет оценить уровень зараженности, установленный в исследовании. Кроме случаев, где нашли *Rickettsia*, доверительный интервал для каждой инфекции одина-

Таблица 4

Выборка *A. decempunctata*, число особей, зараженность симбиотическими бактериями *Rickettsia*, *Wolbachia* и *Spiroplasma*

Популяция	Число особей	Количество случаев (% инфицированности)			95 % доверительный интервал *,**
		<i>Wolbachia</i>	<i>Spiroplasma</i>	<i>Rickettsia</i>	
Чехия, Прага	116	0	0	0	0–3
Франция, Париж	3	0	0	0	–
Россия, Москва	24	0	0	0	0–14
Италия, Рим	20	0	0	0	0–17
Италия, Флоренция	10	0	0	0	0–31
Германия, Гамбург	6	0	0	0	–
Швеция, Стокгольм [10]	18	0	0	4 (22)	0–19*; 6–48**
Россия, Феодосия	12	0	0	1 (8)	0–26*; 0,2–38**
Россия, Ялта	8	0	0	0	–
Всего	204	0	0	5	0,8–5

Примечание. *ДИ рассчитан для выборок ≥ 10 ; **ДИ указаны для *Rickettsia*.

ковый (табл. 4). Малое количество особей в каждом сборе не позволяет с уверенностью судить об уровне инфицированности популяции *A. decempunctata* в целом. В выборке из Праги, где проверяли 116 особей, зараженность симбиотическими бактериями могла быть ниже 3 % и мы ее не определили.

Для изучения разнообразия симбионта были определены нуклеотидные последовательности гена цитрат синтазы (*gltA*) *Rickettsia* из *A. decempunctata* из Феодосии и Стокгольма, из *A. bipunctata fasciatopunctata* из Улан-Уде (Бурятия), *A. bipunctata* и *Coccinella sp.* из г. Кеми (Карелия). Полученные нами последовательности ДНК мы сравнили с аннотирован-

ными для божьих коровок в GenBank. *Rickettsia* из *A. decempunctata* из Феодосии и Стокгольма по изученному участку гена *gltA* различаются двумя заменами нуклеотидов. *Rickettsia* из *A. decempunctata* из Феодосии кластеризуется с *Rickettsia* из *A. bipunctata*, *A. b. fasciatopunctata* и *Coccinella sp.* (рис. 2). ДНК *Rickettsia* из *A. decempunctata* из Стокгольма идентична ДНК бактерии из *A. decempunctata* из Германии и Великобритании (рис. 2). Изученный участок ДНК *Rickettsia* из *A. bipunctata* изменчив и симбионты двухточечной божьей коровки формируют два различающихся кластера на дендрограмме (рис. 2): ДНК гена *gltA* *Rickettsia* из *A. bipunctata* (FJ666763, AJ269519)

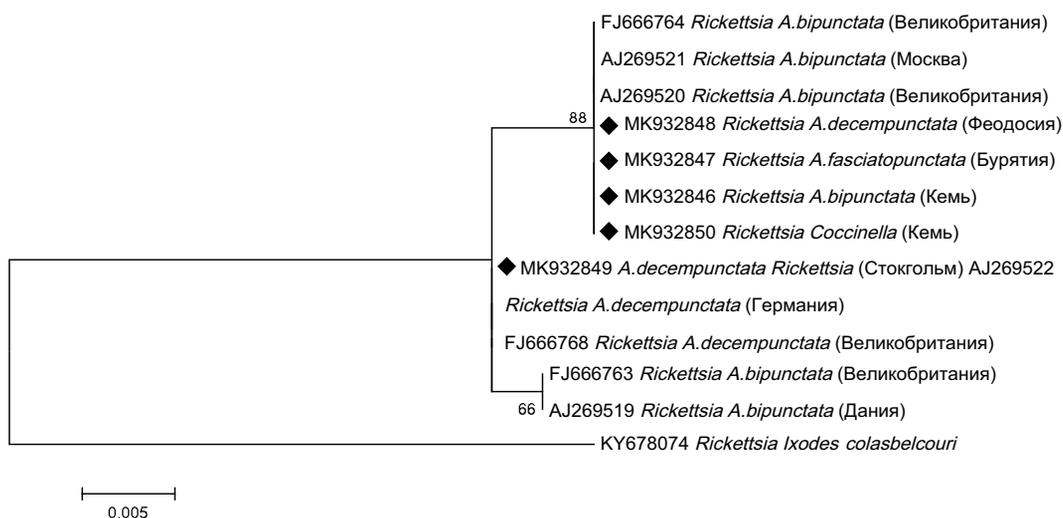


Рис. 2. Дендрограмма сходства последовательностей ДНК гена *gltA* *Rickettsia*. Указаны хозяева внутриклеточных симбиотических бактерий *Rickettsia* и места их сборов. Последовательности, полученные в данной работе, отмечены черными ромбами. Другие последовательности выбраны из GenBank для сравнения, приведены регистрационные номера. ДНК *Rickettsia* из *Ixodes colasbelcourii* использована в качестве аутгруппы

отличается от FJ666764, AJ269520, AJ269521 заменами 4–5 нуклеотидов и только одной заменой от *Rickettsia* из *A. decempunctata* (FJ666768, AJ269522).

ОБСУЖДЕНИЕ

Мы провели масштабное изучение изменчивости ядерной и мтДНК у 92 особей *A. decempunctata* из девяти мест сбора: Праги, Москвы, Рима, Флоренции, Гамбурга, Парижа и Ялты, где не было обнаружено инфицирование симбионтами и у зараженных, и у незараженных *Rickettsia* особей из Стокгольма и Феодосии. Для анализа мтДНК использовали последовательность, аналогичную наиболее вариабельной части гена *COI* у божьих коровок близкого вида *A. bipunctata* [4].

Пять митохондриальных гаплотипов встретились нам в сборе из Праги. Эта выборка среди изученных сборов была самая многочисленная. В других местах сборов число вариабельных гаплотипов мтДНК зависело от численности исследованных особей (табл. 1). В Риме среди 20 коровок обнаружены три типа мтДНК. В Париже, где нам удалось собрать лишь три божьих коровки этого вида, все особи имели одинаковые последовательности гена *COI* гаплотипа Н1. Митохондриальный вариант Н1 представлен во всех сборах (табл. 1). Известные ранее последовательности гена *COI* *A. decempunctata* из Германии (AJ312061) и Великобритании (DQ155924, DQ155760) также относятся к гаплотипу мтДНК, обозначенному нами Н1. Тип Н2 встретился нам в Праге и Флоренции, но также в Москве и Гамбурге. Тип Н3 обнаружен в Праге и Стокгольме.

Таким образом, нам удалось обнаружить восемь митохондриальных гаплотипов у *A. decempunctata*, семь из которых до этого не были известны. Шесть из восьми обнаруженных гаплотипов мтДНК различаются одной заменой среди 616 п. н. Три из восьми гаплотипов присутствуют в генофонде *A. decempunctata*, собранных в географически далеких местах обитания. Четверть исследованных особей в пражской популяции и 40 % коровок из Флоренции обладают уникальным гаплотипом Н2, отличающимся от остальных тремя нуклеотидными заменами (0,49 %). Если принять частоту возникновения мутаций в мтДНК адалий, как и у дрозофилы $6.2 \cdot 10^{-8}$ [23], то время дивергенции гаплотипов Н1 и Н2 составляет 55–83 тыс. лет, учитывая в среднем 1.5 или 1 поколение в год. Разнообразие мтДНК у *A. decempunctata* оказывается старше времени последнего оледенения, которое захватило значительную часть ареала вида в Европе. Идентичность ядерных последовательностей всех изученных *A. decempunctata* свидетельствует об отсутствии препятствий для скрещивания и обмена генетической информацией между особями разных гаплотипов. Сравнение уровней внутривидовой изменчивости ДНК и морфологических признаков у двух близких видов — *A. decempunctata*

и *A. bipunctata* позволяет считать второй вид более изменчивым по мтДНК при сравнимом уровне морфологических различий.

Зараженность симбионтами божьих коровок семейства Coccinellidae интенсивно изучается, часто в связи со значимостью этих насекомых как хищников, вредителей сельского хозяйства [например, 9, 24, 25]. У инвазивного в России вида *Harmonia axyridis* было выявлено заражение *Spiroplasma* в нативных популяциях [26, 27]. У двуточечных божьих коровок *A. bipunctata* обнаружено заражение симбиотическими бактериями трех родов на Европейской и Азиатской частях ареала [7, 10]. *Rickettsia* были найдены у *A. decempunctata* в Англии и Германии [10], *Wolbachia* и *Spiroplasma* не находили.

Проведенный скрининг 199 особей *A. decempunctata* из восьми городов Европы на наличие симбиотических бактерий трех родов — *Rickettsia*, *Wolbachia* и *Spiroplasma* выявил заражение *A. decempunctata* в Феодосии бактерией *Rickettsia*. В 2001 г. мы обнаружили зараженных *Rickettsia* особей *A. decempunctata* в Стокгольме с частотой заражения 23 % [11]. В некоторых исследованных сборах *A. decempunctata* число коровок слишком мало и, возможно, поэтому мы не обнаружили симбиотических бактерий. Частота заражения в Стокгольме в 2001 г. была высокой и вычисление доверительного интервала показало, что могла достигать 48 %. В сборах из Праги заражение не превышает 3 %, если оно присутствует в данной локальной популяции. Известно, что у божьих коровок только часть популяции бывает заражена симбиотическими бактериями. Бактерии часто теряются в популяции [9], если нет селективных факторов, способствующих их распространению. Было обнаружено, что зараженность *Spiroplasma* снижает жизнеспособность личинок *A. bipunctata* [24], в той же работе при инфекции *Rickettsia* и *Wolbachia* подобного эффекта не выявлено. У божьих коровок симбиотические бактерии нарушают репродукцию — потомство мужского пола отсутствует, что приводит к сдвигу в соотношении полов в популяциях в сторону самок. В определенных условиях это придает популяции некоторые преимущества — оставшиеся личинки употребляют остановившиеся в развитии яйца в качестве пищи. Однако, в благоприятных условиях существования незараженные самки оставляют больше потомства, чем зараженные [24]. Несовершенное наследование по материнской линии в сочетании со скромными преимуществами андроцида и отсутствием других преимуществ для инфицированных самок могут создавать сильный отбор против особей, зараженных симбиотическими бактериями.

Зараженность *Rickettsia* обнаружена нами у особей *A. decempunctata*, собранных в Стокгольме и Феодосии, соответственно на северной и южной грани-

цах ареала десятиточечной божьей коровки. Отметим, что это первое сообщение о присутствии *Rickettsia* в южной части ареала вида. Ранее зараженность была установлена только на севере, в Великобритании, Германии [10] и Швеции [11]. Мы исследовали изменчивость гена цитрат синтазы (*gltA*) *Rickettsia*, поскольку этот участок генома бактерии уже изучался в других работах и было показано, что информативность для филогенетического анализа бактерий этого гена выше, чем 16S рРНК [10]. Обнаруженные нами различия в гене *gltA* *Rickettsia* у *A. decempunctata* из Стокгольма и Феодосии могут иметь разную природу. Во-первых, это могут быть независимые или несвязанные друг с другом мутации в данном гене. Во-вторых, в Феодосии возможен горизонтальный перенос бактерии от симпатрического вида *A. bipunctata*. Свидетельства горизонтального переноса симбионта между особями *A. bipunctata* и *A. decempunctata* из Дании были получены при исследовании андроцида, вызываемого *Rickettsia* у *A. decempunctata* [10]. Эту гипотезу поддерживают и находки трех различных штаммов *Rickettsia* в лабораторных линиях *A. bipunctata*, один из которых кластеризуется с *Rickettsia* из *A. decempunctata* на основе сравнения генов *atpA*, *coxA*, *gltA* и 16S рРНК [28]. Наши данные, совместно с полученными на других видах божьих коровок, не поддерживают идею строгой ко-эволюции паразита и хозяина. Изучение большего числа последовательностей ДНК симбионтов *Adalia* и других видов кокцинеллид, собранных в географически удаленных местах, поможет прояснить этот вопрос в будущем.

В наши сборы попали божьи коровки с семью точками на надкрыльях, по морфологии схожие с *Coccinella septempunctata* (Coccinellidae). Определение видовой принадлежности с помощью баркодинга показало, что ДНК гена *COI* изученной особи божьей коровки с семью точками на надкрыльях (МК932845) ранее не регистрировалась. Наиболее близкий вид, *Coccinella magnifica* (KU916547) из Германии, отличается четырьмя заменами нуклеотидов на изученном участке. Поэтому, до получения дополнительной информации мы обозначаем эту особь *Coccinella* sp. Интересно, что в ходе данного исследования мы впервые обнаружили зараженность *Coccinella* sp. бактерией *Rickettsia*. Ранее сообщалось только о *Wolbachia* у жуков этого рода [9, 24, 25]. По ДНК гена *gltA* *Rickettsia* у *Coccinella* sp. оказалась идентична симбионтам *A. bipunctata* (рис. 2). Кроме того, особи *A. bipunctata* и *Coccinella* sp. были собраны в одном месте в г. Кемь (Карелия), что предполагает как возможный горизонтальный перенос бактериальных симбионтов между разными видами кокцинеллид, так и контаминацию *Coccinella* sp. — наличие бактериальной ДНК в пищеварительном тракте *Coccinella* после того, как данная особь питалась яйцами зараженной *Rickettsia* *A. bipunctata*.

Поскольку особи *A. decempunctata*, собранные в Праге, Москве, Ялте, Риме, Флоренции, Гамбурге и в Париже, оказались не зараженными симбиотическими бактериями *Rickettsia*, *Spiroplasma* и *Wolbachia*, это не дало нам возможности установить какую-либо связь между гаплотипом мтДНК и зараженностью симбиотической бактерией, как это имеет место у *A. bipunctata*. В Стокгольме гаплотип Н1 был выявлен у одной зараженной и у неинфицированных *Rickettsia* особей, гаплотип Н3 — у трех зараженных *Rickettsia* особей. Однако, коровки из Праги с гаплотипом Н3 мтДНК оказались не заражены. В Феодосии зараженная *Rickettsia* и незараженные особи обладали гаплотипом Н1. Малый объем материала не позволяет сделать какие-либо выводы о связи гаплотипов мтДНК с зараженностью *Rickettsia*. Количество нуклеотидных замен между *Rickettsia* из *A. decempunctata* и *A. bipunctata* позволяет предполагать единое происхождение симбионта у божьих коровок рода *Adalia* и не исключают последующих горизонтальных переносов между особями обоих видов.

Финансирование. Работа поддержана грантом РФФИ № 19-04-00739, сбор материала частично выполнен И.А. Захаровым по госзаданию № 0112-2019-0002.

ЛИТЕРАТУРА

1. Добржанский Ф.Г. Географическая и индивидуальная изменчивость *Adalia bipunctata* L. и *Adalia decempunctata* L. (Coleoptera, Coccinellidae) // Русское энтомологическое обозрение. — 1924. — Т. 18. — № 4. — С. 201–212. [Dobzhansky T. Über geographische und individuelle Variabilität von *Adalia bipunctata* und *A. decempunctata*. *Russk Entomol Obozrenie*. 1924;18(4):201-211. (In Russ.)]
2. Лус Я.Я. О наследовании окраски и рисунка у божьих коровок *Adalia bipunctata* L. и *Adalia decempunctata* L. // Изв. Бюро генетики АН СССР. — 1928. — № 6. — С. 89–163. [Lus YaYa. On the inheritance of color and pattern in lady beetles *Adalia bipunctata* L. and *Adalia decempunctata* L. *Izv. Byuro genetiki AN SSSR*. 1928;(6):89-163. (In Russ.)]
3. Majerus ME. Ladybirds. London: Harper Collins; 1994. 367 p.
4. Schulenburg JH, Hurst GD, Tetzlaff D, et al. History of infection with different male-killing bacteria in the two-spot ladybird beetle *Adalia bipunctata* revealed through mitochondrial DNA sequence analysis. *Genetics*. 2002;160(3):1075-1086.
5. Jiggins FM, Tinsley MC. An ancient mitochondrial polymorphism in *Adalia bipunctata* linked to a sex-ratio-distorting bacterium. *Genetics*. 2005;171(3):1115-1124. <https://doi.org/10.1534/genetics.105.046342>.
6. Захаров И.А., Шайкевич Е.В. Полиморфизм мтДНК в петербургской популяции *Adalia bipunctata* и его

- связь с зараженностью симбиотической бактерией *Spiroplasma* // Экологическая генетика. — 2011. — Т. 9. — № 1. — С. 27–31. [Zakharov IA, Shaikovich EV. An mtDNA polymorphism in the St. Petersburg population of *Adalia bipunctata* and its correlation with infection by the symbiotic bacterium *Spiroplasma*. *Ecological genetics*. 2011;9(1):27-31. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.1134/S207905971202013X>.
7. Шайкевич Е.В., Ившина Е.В., Захаров И.А. Полиморфизм митохондриальной ДНК и распространение цитоплазматических симбионтов в популяциях двуточечной божьей коровки *Adalia bipunctata* // Генетика. — 2012. — Т. 48. — № 5. — С. 666–671. [Shaikovich EV, Ivshina EV, Zakharov IA. Polymorphism of mtDNA and distribution of cytoplasmic symbionts in populations of the two-spot ladybird beetle *Adalia bipunctata*. *Russian Journal of Genetics*. 2012;48(5):567-571. (In Russ.)]
 8. Hilgenboecker K, Hammerstein P, Schlattmann P, et al. How many species are infected with *Wolbachia*? — A statistical analysis of current data. *FEMS Microbiol Lett*. 2008;281(2):215-220. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2008.01110.x>.
 9. Elnagdy S, Messing S, Majerus ME. Two strains of male-killing *Wolbachia* in a ladybird, *Coccinella undecimpunctata*, from a hot climate. *PLoS ONE*. 2013;8(1): e54218. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054218>.
 10. Von der Schulenburg JH, Habig M, Sloggett JJ, et al. Incidence of male-killing *Rickettsia* spp. (alpha-proteobacteria) in the ten-spot ladybird beetle *Adalia decempunctata* L. (Coleoptera: Coccinellidae). *Appl Environ Microbiol*. 2001;67(1):270-277. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.1.270-277.2001>.
 11. Zakharov IA, Shaikovich EV. The Stockholm populations of *Adalia bipunctata* (L.) (Coleoptera: Coccinellidae) — a case of extreme female-biased population sex ratio. *Hereditas*. 2001;134(3):263-266. <https://doi.org/10.1111/j.1601-5223.2001.00263.x>.
 12. Weinert LA, Tinsley MC, Temperley M, Jiggins FM. Are we underestimating the diversity and incidence of insect bacterial symbionts? A case study in ladybird beetles. *Biol Lett*. 2007;3(6):678-681. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2007.0373>.
 13. Van Kuppeveld FJ, van der Logt JT, Angulo AF, et al. Genus- and species-specific identification of mycoplasmas by 16S rRNA amplification. *Appl Environ Microbiol*. 1992;58(8):2606-2615.
 14. Braig HR, Zhou W, Dobson SL, O'Neill SL. Cloning and characterization of a gene encoding the major surface protein of the bacterial endosymbiont *Wolbachia*. *J Bacteriol*. 1998;180(9):2373-2378.
 15. Porter CH, Collins FH. Species-diagnostic differences in a ribosomal DNA internal transcribed spacer from the sibling species *Anopheles freeborni* and *Anopheles hermsi* (Diptera: Culicidae). *Am J Trop Med Hyg*. 1991;45(2):271-279. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1991.45.271>.
 16. Tamura K, Stecher G, Peterson D, et al. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol Biol Evol*. 2013;30(12):2725-2729. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst197>.
 17. Librado P, Rozas J. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*. 2009;25(11):1451-1452. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp187>.
 18. Bandelt HJ, Forster P, Röhl A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol Biol Evol*. 1999;16(1):37-48. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a026036>.
 19. Животовский Л.А. Показатель внутривидового разнообразия // Журнал общей биологии. — 1980. — Т. 41. — № 6. — С. 828-836. [Zhivotovskiy LA. Pokazatel' vnutripopulyatsionnogo raznoobraziya. *Journal of general biology*. 1980;41(6): 828-836. (In Russ.)]
 20. Токарев Ю.С., Юдина М.А., Малыш Ю.М., и др. Встречаемость эндосимбиотической бактерии рода *Wolbachia* в природных популяциях *Ostrinia nubilalis* и *Ostrinia scapularis* (Lepidoptera: Pyraloidea: Crambidae) на юго-западе России // Экологическая генетика. — 2017. — Т. 15. — № 1. — С. 44–49. [Tokarev YuS, Yudina MA, Malyshev YuM, et al. Prevalence rates of *Wolbachia* endosymbiotic bacterium in natural populations of *Ostrinia Nubilalis* and *Ostrinia Scapularis* (Lepidoptera: Pyraloidea: Crambidae) in South-Western Russia. *Ecological genetics*. 2017;15(1):44-49. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.17816/ecogen15144-49>.
 21. Юдина М.А., Быков Р.А., Котти Б.К., и др. Наследуемые бактерии рода *Wolbachia* в популяциях блох (Insecta: Siphonaptera) // Журнал общей биологии. — 2018. — Т. 79. — № 3. — С. 237–246. [Yudina MA, Bykov RA, Kotti BK, et al. *Wolbachia* infection in flea populations (Insecta: Siphonaptera). *Journal of general biology*. 2018;79(3):237-246. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.7868/S0044459618030053>.
 22. Bykov RA, Yudina MA, Gruntenko NE, et al. Prevalence and genetic diversity of *Wolbachia* endosymbiont and mtDNA in Palearctic populations of *Drosophila melanogaster*. *BMC Evol Biol*. 2019;19(Suppl 1):48. <https://doi.org/10.1186/s12862-019-1372-9>.
 23. Haag-Liautard C, Coffey N, Houle D, et al. Direct estimation of the mitochondrial DNA mutation rate in *Drosophila melanogaster*. *PLoS Biol*. 2008;6(8): e204. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0060204>.
 24. Elnagdy S, Majerus ME, Handley LJ. The value of an egg: resource reallocation in ladybirds (Coleoptera: Coccinellidae) infected with male-killing bacteria. *J Evol Biol*. 2011;24(10):2164-2172. <https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2011.02346.x>.

25. Kajtoch Ł, Kotásková N. Current state of knowledge on *Wolbachia* infection among Coleoptera: a systematic review. *Peer J.* 2018;6: e4471. <https://doi.org/10.7717/peerj.4471>.
26. Nakamura K, Ueno H, Miura K. Prevalence of inherited male-killing microorganisms in Japanese population of ladybird beetle *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae). *Annals of the Entomological Society of America.* 2005;98(1):96-99. [https://doi.org/10.1603/0013-8746\(2005\)098\[0096:POIMMI\]2.0.CO](https://doi.org/10.1603/0013-8746(2005)098[0096:POIMMI]2.0.CO).
27. Goryacheva I, Blekhman A, Andrianov B. et al. Spiroplasma infection in *Harmonia axyridis* – Diversity and multiple infection. *PLoS One.* 2018;13(5): e0198190. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198190>.
28. Weinert LA, Werren JH, Aebi A. et al. Evolution and diversity of *Rickettsia* bacteria. *BMC Biol.* 2009;7:6. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-7-6>.

✿ Информация об авторах

Елена Владимировна Шайкевич — д-р биол. наук, ведущий научный сотрудник, лаборатория генетики насекомых. ФГБУН «Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова» РАН, Москва, Россия. SPIN: 4746-3067. E-mail: elenashaikevich@mail.ru.

Илья Артемьевич Захаров — член-корр. РАН, д-р биол. наук, главный научный сотрудник, лаборатория генетики насекомых. ФГБУН «Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова» РАН, Москва, Россия. E-mail: iaz34@mail.ru.

Алоис Хонек — д-р биол. наук, главный научный сотрудник. Научно-исследовательский институт изучения сельскохозяйственных культур, Прага-Ружине, Чехия. E-mail: honek@vurv.cz.

✿ Authors and affiliations

Elena V. Shaikovich — Doctor of Science, Main Researcher, Laboratory of Insect Genetics. Vavilov Institute of General Genetics, Moscow, Russia. SPIN: 4746-3067. E-mail: elenashaikovich@mail.ru.

Ilya A. Zakharov — Doctor of Science, Main Researcher, Laboratory of Insect Genetics. Vavilov Institute of General Genetics, Moscow, Russia. E-mail: iaz34@mail.ru.

Alois Honek — Doctor of Science, Main Researcher. Crop Research Institute, Prague-Ruzyně, Czech Republic. E-mail: honek@vurv.cz.