

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

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

²Московский Государственный
Университет им. М. В. Ломоносова,
Москва

Проведен анализ ДНК

A. b. turanica, *A. b. revelierei* и *A. b. fasciatopunctata*, отличающихся от европейской формы *A. b. bipunctata* многими пятнами на красных или розовых надкрыльях и распространенных в краевых областях ареала: были обнаружены 20 вариабельных мт-гаплотипов по гену *COI*, но ни один из них не был уникальным для какой-либо из форм; все изученные особи, вне зависимости от митохондриального гаплотипа, обладали практически идентичными последовательностями ITS2. Формы *A. bipunctata*, которые входят в состав полиморфных популяций *A. b. revelierei*, *A. b. turanica*, *A. b. fasciatopunctata*, являются географическими разновидностями *A. bipunctata*. Различия в структуре ДНК позволяют считать *Adalia bipunctata* и *Adalia frigida* близкими, но самостоятельными видами.

✿ **Ключевые слова:** *Adalia*, полиморфизм популяций; мтДНК; ядерная ДНК; адаптация.

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ ГЕОГРАФИЧЕСКИХ ФОРМ ЖУКОВ *ADALIA BIPUNCTATA* И *A. FRIGIDA*

ВВЕДЕНИЕ

Вид *Adalia bipunctata* Linnaeus, 1758 (Coccinellidae, Coleoptera) и близкие к нему формы с не вполне ясным таксономическим статусом занимают огромный ареал — приполярные, умеренного климата и субтропические зоны Старого и Нового Света. *Adalia bipunctata sensu stricto* в Евразии встречается, по нашим наблюдениям, от Испании до Камчатки и от Кольского полуострова до Крыма и юга Италии. Этот вид полиморфен, во всех его популяциях обнаруживаются формы с красной и черной окраской надкрылий, на красном фоне обычно два округлых черных пятна, на черном 2–4–6 красных пятен. На севере и на юге появляются особи со многими темными пятнами на красном или розовом фоне. Такие формы систематиками обычно описываются не как *A. bipunctata*, а причисляются (ошибочно) к близкому, но самостоятельному виду *A. decempunctata* Linnaeus, 1758, который встречается только в Европе, либо получают самостоятельный видовой статус: *A. revelierei* Mulsant, 1866 (малая и Передняя Азия, Закавказье), *A. turanica* Lasis, 1947 (Средняя Азия), *A. fasciatopunctata* Mader, 1931 (Монголия, Тува, Забайкалье и прилегающая часть Сибири), *A. frigida* Schneider, 1792 (приполярные районы). Я. Я. Лусис, проводивший генетические эксперименты, пришел к выводу, что южные формы с многими пятнами не принадлежат к самостоятельным видам, а входят в состав полиморфных популяций *A. bipunctata*. Результаты гибридологического анализа формы *fasciatopunctata* Я. Я. Лусис не опубликовал, а *A. frigida* была им признана самостоятельным видом (Лусис, 1976).

Задача настоящей работы — уточнить статус форм *Adalia*, обитающих на юге и на севере (в пределах бывшего СССР) с использованием молекулярно-генетических методов. Сравнительный анализ ДНК полиморфных форм адалий практически не проводился, отсутствие полиморфизма в 3' последовательности гена цитохромоксидазы I (*COI*) между *A. b. bipunctata* и *A. b. fasciatopunctata* было обнаружено в работе Паленко и соавторов (2004). Нами ранее была исследована структура ДНК у *A. b. bipunctata*, *A. b. fasciatopunctata*, *A. decempunctata*, *A. tetraspilota*, и одной особи *A. frigida* из популяции Архангельска (Zakharov, Shaikevich, 2013). В данной работе мы исследовали ДНК *A. frigida* из нескольких удаленных популяций, *A. b. revelierei* и *A. b. turanica* и сравнили с исследованными нами ранее *A. b. bipunctata* и *A. b. fasciatopunctata*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для настоящей работы были использованы жуки из следующих мест сбора: район озера Иссык-Куль, Киргизия (1997); Чита (2012); Хангалас, республика Саха Якутия (2011); Ереван, Армения (2013). Из сборов Киргизии была изучена одна особь, которая по морфологии относилась к подвиду *A. b. turanica*. В сборе из Еревана присутствовали как типичные по окраске жуки *A. bipunctata*, так и жуки, окраска которых соответствовала *A. revelierei*. В сборах из Якутии жуки соответствовали *A. frigida*. В сборах из Читы были типичные особи *A. bipunctata*, соответствующие *A. frigida* и жуки с промежуточным рисунком.

Поступила в редакцию 24.06.2014
Принята к публикации 30.09.2014

Для выделения ДНК из жуков использовали набор DIAtom™ DNA Prep (Изоген, Москва). В реакции амплификации использовали по 0,1 мкг выделенной ДНК. Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили на термоциклере GeneAmp[®] PCR System 2700 (Applied Biosystems, USA), применяя наборы для амплификации GenePak™ PCR Core (Изоген, Москва) и Evrogen Encyclo PCR kit (Evrogen JSC, Москва), придерживаясь инструкции производителя.

Для амплификации наиболее изменчивого района — средней области гена *COI* — в ПЦР были использованы праймеры C1-j-1951 и C1-N-2618 (Schulenburg et al., 2002). Были получены амплифицированные продукты размером 700 п.н. Условия ПЦР: первичная денатурация — 5 мин при 94 °С; 35 циклов: денатурация при 94 °С — 30 с, отжиг при 55 °С — 40 с, синтез при 72 °С — 40 с; завершающий синтез при 72 °С — 10 мин.

Для амплификации области второго внутренне-го транскрибируемого спейсера (ITS2) кластера генов рРНК были использованы праймеры, комплементарные к районам 5,8S и 28S рРНК (Proft et al., 1999) и получены характерные для адалий ПЦР продукты, размером около 900 п.н. Условия ПЦР те же, что и для гена *COI*.

Ампликоны выявляли путем электрофореза в 1%-м агарозном геле (Sigma, США). Амплифицированные фрагменты ДНК выделяли из геля с использованием набора JETQUICK Gel Extraction Spin Kit (Genomed,

Germany) для последующего секвенирования. Секвенирование проводили на приборе ABI PRISM 310 с использованием реагентов фирмы «Applied», США, по инструкции производителя. Сопоставление нуклеотидных последовательностей выполняли с использованием программ ChromasPro и MEGA version 4.0 (Tamura et al., 2007).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Среди собранных жуков были определены нуклеотидные последовательности гена *COI* и области ITS2 кластера рибосомных генов. Полученные результаты мы сравнили с исследованными нами ранее *A. b. bipunctata* и *A. b. fasciatopunctata* из Бурятии.

Подвиды *A. bipunctata*

Изменчивость митохондриальной ДНК

Полиморфизм мтДНК мы исследовали, определяя нуклеотидные последовательности средней области гена *COI*, одного из наиболее изменчивых районов в митохондриальном геноме адалий. Ранее были обнаружены 18 переменных мт-гаплотипов по данному участку генома (Шайкевич с соавт., 2012). Различия между мт-гаплотипами, как правило, составляют от одного до четырех нуклеотидных замен, два мт-гаплотипа H9 и H10 значительно отличаются от остальных (Zakharov, Shaikevich, 2013) (рис. 1).

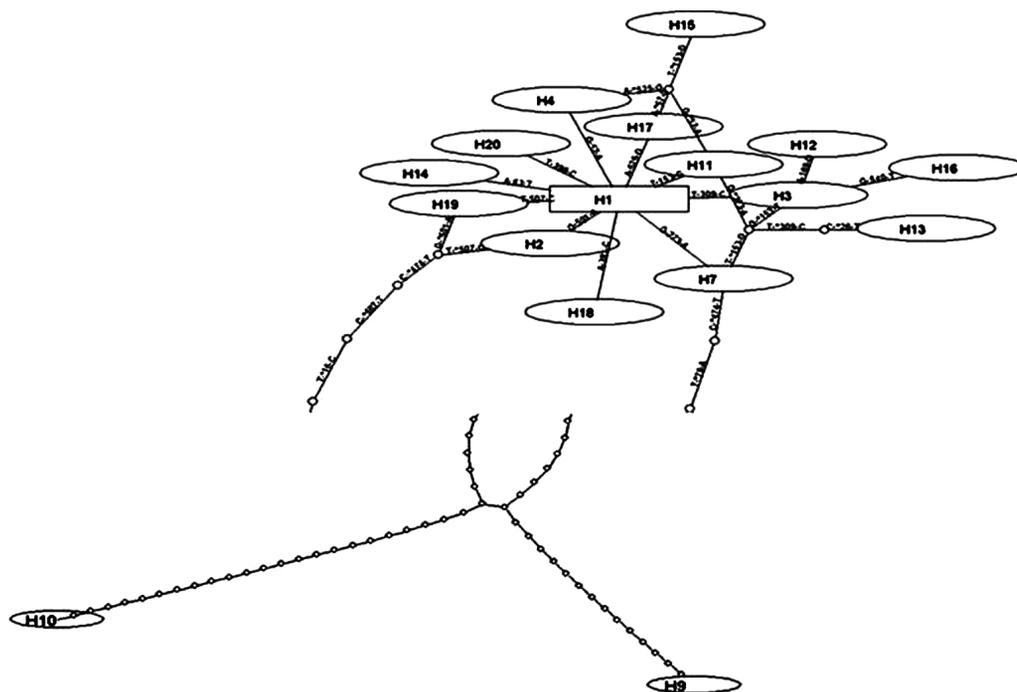


Рис. 1. Медианная сеть митохондриальных гаплотипов двуточечной божьей коровки *A. bipunctata* L. (Coleoptera, Coccinellidae). Длина ветвей, соединяющих гаплотипы H9 и H10 с гаплотипами H19, H2 и H7, пропорциональна количеству мутационных шагов и представлена внизу в меньшем масштабе. На линиях, соединяющих гаплотипы, указаны различающие их мутации

Таблица 1

Распределение митохондриальных гаплотипов по гену *COI* у особей из изученных популяций

Популяция	Тип рисунка на надкрыльях	Митотип	Количество особей
Бурятия, Иволгинский дацан	<i>A. b. bipunctata</i>	H1	8
		H10	2
	<i>A. b. fasciatopunctata</i>	H1	8
		H10	2
Ереван	<i>A. b. bipunctata</i>	H1	8
		H4	1
		H9	2
	<i>A. b. revelierei</i>	H19	1
		H1	6
		H3	1
Киргизия	<i>A. b. turanica</i>	H20	1
		H1	1
		H1	1

A. b. bipunctata объединяет особи с надкрыльями двух типов: красными с двумя пятнами и черными

Среди ереванской популяции адалий были исследованы последовательности гена *COI* у 8 жуков с фенотипом *A. b. revelierei* и 12 жуков с фенотипом *A. b. bipunctata* turica. Идентичные мт-гаплотипы были обнаружены у особей обеих форм: у 20 жуков были обнаружены 5 уже известных митотипа и два новых, которые отличаются от ранее обнаруженных одной нуклеотидной заменой. Мы обозначили их H19 и H20, продолжая имеющиеся обозначения (Schulenburg et al., 2002; Захаров, Шайкевич, 2011). У особей с фенотипом *A. b. revelierei* преобладающим митотипом оказался H1 (табл. 1), также как и у особей из других популяций комплекса *A. bipunctata*. У одной особи был обнаружен митотип H3 и одна особь обладала новым митотипом, который мы назвали H20. Среди типичных *A. b. bipunctata* из Еревана 8 особей имели H1, по одной особи — H4 и H19. Две особи *A. b. bipunctata* из Ереванской популяции обладали мт-гаплотипом H9.

Имеющаяся в нашем распоряжении *A. b. turanica* обладала мт-гаплотипом H1 гена *COI*. Среди *A. b. fasciatopunctata* ранее нами были обнаружены мт-гаплотипы H1 и H10, оба гаплотипа характерны для особей номинальной формы *A. b. bipunctata* (табл. 1).

Средне число нуклеотидных замен на сайт у 29 особей разных форм комплекса *A. bipunctata* с мт-гаплотипами H1, H3, H4, H19 и H20 составляет 0,001 (табл. 2). Различия H9 и H10 от других мт-гаплотипов достигают уровня межвидовых различий (табл. 2).

Полиморфизм ядерной ДНК

Мы изучили полиморфизм области второго внутреннего транскрибируемого спейсера (ITS2) кластера генов рРНК у *A. b. bipunctata*, *A. b. turanica*, *A. b. revelierei* и *A. b. fasciatopunctata* из географически удаленных мест сбора. Сравнение нуклеотидных последовательностей 26 особей всех исследуемых форм *A. bipunctata*, обла-

Таблица 2

Уровень эволюционной дивергенции между последовательностями *COI* гена исследованных подвидов и видов р. *Adalia*

Вид, подвид	<i>A. b. bipunctata</i> *	<i>A. b. fasciatopunctata</i> *	<i>A. b. turanica</i>	<i>A. b. revelierei</i>	<i>A. frigida</i>	H9
<i>A. b. bipunctata</i> *						
<i>A. b. fasciatopunctata</i> *	0,001					
<i>A. b. turanica</i>	0,001	0,001				
<i>A. b. revelierei</i>	0,001	0,001	0,001			
<i>A. frigida</i>	0,043	0,043	0,043	0,043		
H9 <i>A. bipunctata</i>	0,043	0,043	0,043	0,043	0,023	
H10 <i>A. bipunctata</i>	0,067	0,067	0,067	0,067	0,070	0,067

Уровни дивергенции выражены в величинах, обозначающих среднее число нуклеотидных замен между двумя сравниваемыми последовательностями в пересчете на один сайт. * — включая все мт-гаплотипы, за исключением H9, H10

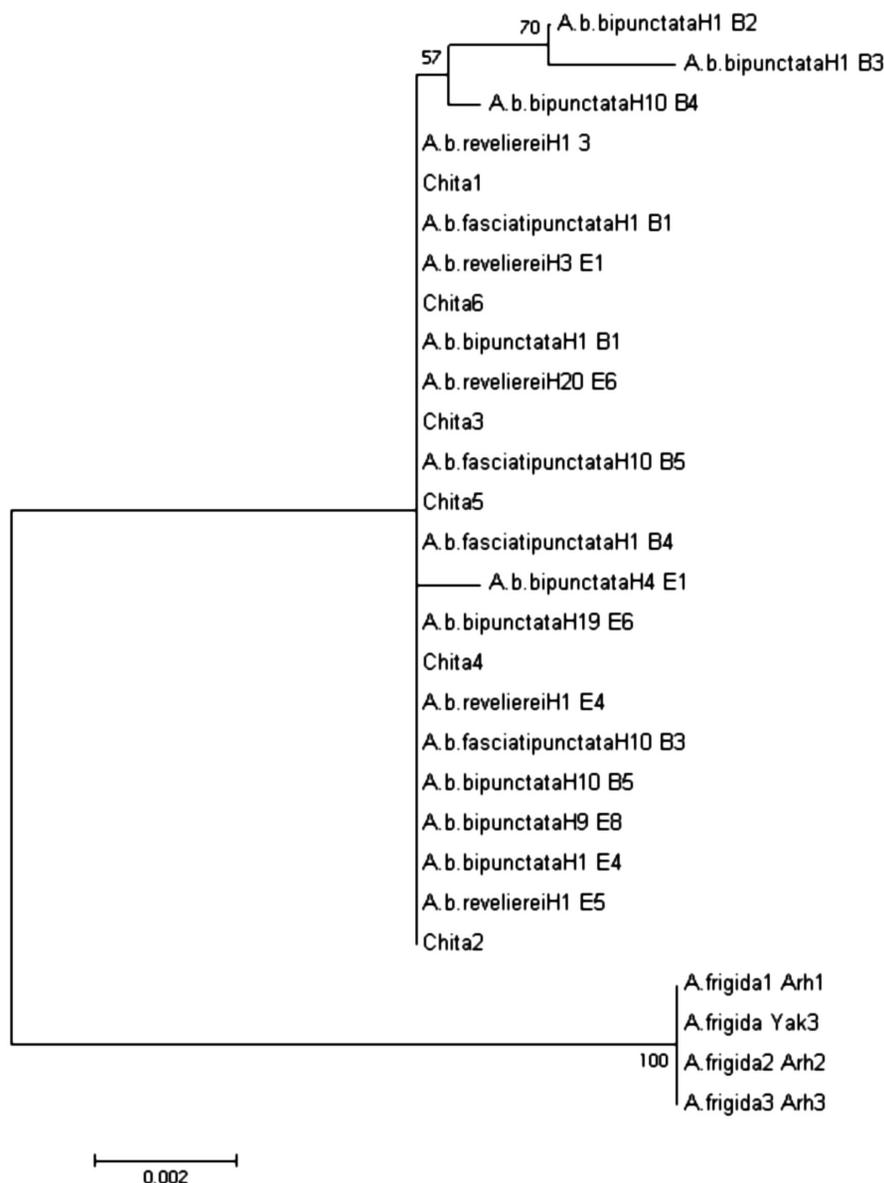


Рис. 2. Дендрограмма сходства последовательностей нуклеотидов ITS2 *A. bipunctata* и *A. frigida*, построенная с использованием метода Neighbor-Joining (NJ). Цифрами указаны бутстреп-коэффициенты, рассчитанные для 1000 повторов. H1–H20 — обозначения митохондриальных гаплотипов. В — Бурятия; Е — Ереван; Yak — Якутия; Arh — Архангельск; цифрами обозначены номера особей из популяции. Chita — жуки из Читы, по фенотипу подобные *A. frigida*

дающих различающимися мт-гаплотипами, не выявило значимых различий — различающиеся по морфологии божьи коровки обладают практически идентичными последовательностями ITS2 и образуют монофилетический кластер на дендрограмме (рис. 2). Средне число нуклеотидных замен на сайт у 25 особей *A. bipunctata* составляет 0,001.

A. bipunctata и *A. frigida*

A. frigida обитает на севере Евразии, от Скандинавии до Якутии. По нашим наблюдениям, в Архангельске *A. bipunctata* и *A. frigida* обитают совместно.

Для исследования в нашем распоряжении были одна особь *A. frigida* и ее потомки из Архангельска, 6 особей из Читы и 3 из Якутии (табл. 3). В сборе из Читы среди особей были типичные по рисунку *A. frigida*, т. е. с несколькими пятнами, расположенными в два ряда в задней части надкрылий и особи с промежуточным рисунком. Особи из Якутии фенотипически соответствовали *A. frigida*.

ДНК гена *COI* у особей *A. frigida* отличается от ДНК *A. bipunctata* на 4,3% (табл. 2). Такие последовательности были обнаружены нами у особей из Архангельска, одной из Читы и двух из Якутии. Остальные

Таблица 3

Типы *COI* и *ITS2* у божьих коровок из Архангельска, Читы и Якутска

Место сбора	Фенотип	№ особи	<i>COI</i>	<i>ITS2</i>
Архангельск	<i>A. frigida</i>	1	<i>A. frigida</i>	<i>A. frigida</i>
	<i>A. frigida</i>	2 (F1)	<i>A. frigida</i>	<i>A. frigida</i>
	<i>A. frigida</i>	3 (F1)	<i>A. frigida</i>	<i>A. frigida</i>
Чита	<i>A. frigida</i>	1	<i>A. frigida</i>	<i>A. bipunctata</i>
	<i>A. frigida</i>	2	<i>A. bipunctata</i>	<i>A. bipunctata</i>
	<i>A. fr./A. bip.</i>	3	<i>A. bipunctata</i>	<i>A. bipunctata</i>
	<i>A. fr./A. bip.</i>	4	<i>A. bipunctata</i>	<i>A. bipunctata</i>
	<i>A. fr./A. bip.</i>	5	<i>A. bipunctata</i>	<i>A. bipunctata</i>
	<i>A. frigida</i>	6	<i>A. bipunctata</i>	<i>A. bipunctata</i>
Якутск	<i>A. frigida</i>	1	<i>A. frigida</i>	н/о
	<i>A. frigida</i>	2	<i>A. bipunctata</i>	н/о
	<i>A. frigida</i>	3	<i>A. frigida</i>	<i>A. frigida</i>

исследованные особи, несмотря на морфологическое сходство с *A. frigida* обладали мтДНК, соответствующей *A. bipunctata* (табл. 3).

Мы сравнили обнаруженные нами у *A. frigida* гаплотипы гена *COI*. Последовательности гена *COI* двух особей из Якутии и одной из Читы идентичны между собой. Нуклеотидные последовательности гена *COI* у жука из Архангельска отличаются шестью заменами от таковых у жуков из Якутии и Читы, что составляет 0,7 % (рис. 3). Замены нуклеотидов не приводят к смене аминокислотных последовательностей.

ДНК области *ITS2* у *A. frigida* из Архангельска и Якутии идентичны между собой и отличаются от ДНК *A. bipunctata*, различия составляют 1,8 % (рис. 2). Для двух особей из Якутии нам не удалось получить качественных последовательностей ДНК области *ITS2*, выделение ДНК проводилось из коллекционного материала (сухих жуков). *ITS2* всех исследованных особей из Читы, несмотря на фенотипическое сходство с *A. frigida*, соответствует ДНК *A. bipunctata* (табл. 3).

[222244]
[377916]
[469118]
#frigidal_Arkhangelsk	TTCACC
#frigidal_Chita	ACTGCA
#frigidal_Yakutia	ACTGCA
#frigida3_Yakutia	ACTGTA

Рис. 3. Варибельные сайты нуклеотидных последовательностей гена *COI* *A. frigida* из удаленных популяций

ОБСУЖДЕНИЕ

Выполненные нами исследования позволили впервые определить последовательности генов мтДНК и рРНК для *A. frigida*, *A. b. turanica* и *A. b. revelierei* и провести сравнение этих видов и подвидов с *A. b. bipunctata* и *A. b. fasciatopunctata*. Проведенный анализ ДНК *A. b. turanica*, *A. b. revelierei* и *A. b. fasciatopunctata*, отличающихся от европейской формы *A. b. bipunctata* узором на надкрыльях и распространенных в краевых областях ареала, не обнаружил отличий последовательности *ITS2* от номинальной формы *A. bipunctata* и разницы в гаплотипическом разнообразии по гену *COI* митохондриальной ДНК.

Среди *A. b. bipunctata*, *A. b. fasciatopunctata*, *A. b. revelierei* и *A. b. turanica* были обнаружены 20 варибельных мт-гаплотипов по гену *COI*, но ни один из них не был уникальным для какой-либо из форм. Различия 18 из обнаруженных 20 мт-гаплотипов между собой составляют от 1 до 4 нуклеотидов. Мт-гаплотип H1 является самым распространенным гаплотипом во всех выборках и на медианной сети видно, что он является корневым, предковым гаплотипом по отношению к остальным семнадцати. Два мт-гаплотипа, H9 и H10, значительно отличаются от остальных. Гаплотип H9, встречающийся в популяциях *A. bipunctata* северных районов Европы (Schulenburg et al., 2002; Jiggins, Tinsley, 2005), в Санкт-Петербурге и Архангельске (Захаров, Шайкевич, 2011; Zakharov, Shaikevich, 2013) обнаружен нами и у особей *A. b. revelierei* из популяции Еревана. Мт-гаплотип H10 был обнаружен нами в популяциях *A. b. bipunctata* на севере Европейской части России в Санкт-Петербурге, Архангельске, Кеми, а также и у особей *A. b. fasciatopunctata* на востоке страны в Забайкалье, Улан-Уде, Бурятия (Zakharov, Shaikevich, 2013).

В отличие от мтДНК область ITS2 оказалась абсолютно консервативной. Все изученные особи *A. bipunctata*, вне зависимости от митохондриального гаплотипа, обладали практически идентичными последовательностями ITS2.

Проведенный анализ структуры ДНК *A. b. fasciatopunctata*, *A. b. revelierei* и *A. b. turanica*, не обнаружил различия в нуклеотидном составе ДНК изученных генов. На основании анализа ДНК нельзя считать морфологически различающиеся формы *A. b. bipunctata*, *A. b. fasciatopunctata*, *A. b. revelierei* и *A. b. turanica* отдельными самостоятельными видами. Можно утверждать, что *A. b. fasciatopunctata*, *A. b. revelierei* и *A. b. turanica*, иногда описываемые как отдельные виды, являются лишь географическими формами политипического вида *Adalia bipunctata*.

Из других видов жуков рода *Adalia*, к *A. bipunctata* наиболее эволюционно близким видом является *A. frigida* (Zakharov, Shaikevich, 2013). Отношение коровок данного вида к комплексу *Adalia bipunctata* остается до конца не выясненным. Я. Я. Лусис отмечал репродуктивную изолированность жуков *A. bipunctata* и *A. frigida*, хотя и наблюдал появление гибридов первого поколения, а нарушение процессов размножения проявлялись только со второго поколения (Лусис, 1976). Смешанные популяции и копулирующие особи *A. frigida* с типичными *A. bipunctata* наблюдались в Забайкалье, где были обнаружены также и существенные экологические и поведенческие различия между ними. В работе Бутько Е. В. были выявлены различные предпочтения мест зимовок и питания особей двух видов и предполагается существование частичной пространственной (биотопической), временной и поведенческой изоляции особей *A. frigida* в пределах забайкальских популяций *A. bipunctata* (Бутько, 2005).

На основании анализа ДНК виды *A. bipunctata* и *A. frigida* различаются по нуклеотидному составу области ITS2 на 1,8 %, гена *COI* на 4,3 % (табл. 2, рис. 2), при этом различия по двум исследованным нами участкам генома сохраняются в удаленных друг от друга популяциях. Изменчивость ДНК гена *COI* между особями *A. frigida* из Архангельска и Сибири составляет 0,7 %, что свидетельствует о возрасте расхождения данных популяций в 0–130 тысяч лет, если считать скорость возникновения мутаций в мтДНК равной 6×10^{-8} , принятую для *Drosophila* (Haag-Liautard et al., 2008) и среднее число генераций в год — 1,5. Анализ нуклеотидных последовательностей *COI* и ITS2 у божьих коровок, морфологически схожих с *A. frigida* из Читы и Якутии, выявил случаи, когда особи с фенотипом одного вида имели ДНК другого вида. Одним из объяснений может быть то, что это гибриды первого поколения, как те, что наблюдал Я. Я. Лусис (1976), другим — митохондриальная интрогрессия среди *A. bipunctata* и *A. frigida*, но тогда следует признать фертильность гибридов и возможность возвратных скрещиваний с родительскими видами в природе.

Итак, выше изложенные результаты подтвердили существование в роде *Adalia* двух, вероятно, скрещивающихся в зонах симпатрии, близких, но самостоятельных видов *Adalia bipunctata* Linnaeus, 1758 и *Adalia frigida* Schneider, 1792. Ранее мы, с использованием тех же молекулярно-генетических методов, подтвердили видовой статус *Adalia decempunctata* и *Adalia tetraspilota* (Zakharov, Shaikevich, 2013). Данные настоящего исследования позволяют «закрыть» виды *A. revelierei*, *A. turanica* и *A. fasciatopunctata*, которые оказываются географическими разновидностями (или подвидами) *A. bipunctata*, как и считал в свое время Я. Я. Лусис (1973).

Изученные в настоящей работе формы *A. bipunctata* со многими пятнами на красных или розовых надкрыльях, которые входят в состав полиморфных популяций подвигов *A. b. revelierei*, *A. b. turanica*, *A. b. fasciatopunctata*, являются проявлением аллелей гена *S*. Другие аллели этого гена определяют «европейские» варианты окраски и рисунка надкрылий — красную с двумя точками, либо черную с красными пятнами (Лус, 1928; Лусис 1973; Захаров, 1996). Обращает на себя внимание тот факт, что формы *A. bipunctata* со многими пятнами никогда не встречаются в Европе. Они характерны только для регионов с резко-континентальным климатом и со степной или полупустынной растительностью: Армении, Киргизии, Узбекистана, Монголии, Тувы, Бурятии, Забайкалья. Можно предположить, что либо соответствующие такому рисунку аллели сами имеют плейотропный физиологический эффект, либо они тесно сцеплены (образуют устойчивые гаплотипы) с генами, благоприятствующими выживанию в условиях резко континентального и засушливого климата. В более влажных регионах — Европе, Сибири, эти генотипические варианты оказываются неадаптивными и не поддерживаются в популяциях.

Авторы благодарны С. О. Сергиевскому, О. В. Корсуну, С. Ноговициной, П. Ноговицыну, К. Арутюновой, предоставившим свои сборы коровок из Киргизии, Читы, Якутии и Еревана соответственно. Работа выполнена при финансовой поддержке программы Президиума Российской академии наук «Живая природа: современное состояние и проблемы развития».

ЛИТЕРАТУРА

1. Бутько Е. В. (2005) Экология и внутривидовая изменчивость кокцинеллид (Coleoptera, Coccinellidae) в Восточном Забайкалье. Автореферат диссертации канд. биол. наук. Улан-Удэ. 185 с.
2. Захаров И. А. (1996) Изучение наследования рисунка на надкрыльях у *Adalia bipunctata*. Генетика. Т. 32(4): С. 579–583.
3. Захаров И. А., Шайкевич Е. В. (2011) Полиморфизм мтДНК в Петербургской популяции *Adalia bipun-*

- ctata* и его связь с зараженностью симбиотической бактерией *Spiroplasma*. Экологическая генетика. Т. IX(1): С. 27–31.
4. Лус Я.Я. (1928) О наследовании окраски и рисунка у божьих коровок *Adalia bipunctata* L. и *Adalia decempunctata* L. Изв. Бюро ген. Т. 6: С. 89–163.
 5. Лусис Я.Я. (1973) Таксономические отношения и географическое распространение форм жуков рода *Adalia Mulsant*. Уч. зап. Латв. гос. ун-та. Т. 184(1): С. 5–128.
 6. Лусис Я.Я. (1976) О систематическом положении *Adalia frigida* Schneider (Coleoptera, Coccinellidae). Генетико-селекционные исследования в Латв. ССР. тез. докл. конф. Рига: Зинатие. С. 3–6.
 7. Паленко М. В., Муха Д. В., Захаров И. А. (2004) Изменчивость митохондриального гена цитохромоксидазы I внутри вида *Adalia bipunctata* и между видами жуков семейства божьи коровки (Coleoptera, Coccinellidae). Генетика. Т. 40(2): С. 205–209.
 8. Шайкевич Е. В., Ившина Е. В., Захаров И. А. (2012) Полиморфизм митохондриальной ДНК и распространение цитоплазматических симбионтов в популяциях двуточечной божьей коровки *Adalia bipunctata*. Генетика. Т. 48(5): С. 666–671.
 9. Haag-Liautard C, Coffey N, Houle D, Lynch M, Charlesworth B, et al. (2008) Direct estimation of the mitochondrial DNA mutation rate in *Drosophila melanogaster*. PLoS Biol. V. 6 (8): e204. doi:10.1371/journal.pbio.0060204.
 10. Jiggins F.M. (2003) Male-killing *Wolbachia* and mitochondrial DNA: selective sweeps, hybrid introgression and parasite population dynamics. Genetics. V. 164: P. 5–12.
 11. Porter C.H., Collins F.H. (1991) 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. V. 45: P. 271–279.
 12. Schulenburg J.H., Hurst G.D., Tetzlaff D. et al. (2002) History of infection with different male-killing bacteria in the two-spot ladybird beetle *Adalia bipunctata* revealed through mitochondrial DNA sequence analysis. Genetics. V. 160: P. 1075–1086.
 13. Tamura K., Dudley J., Nei M., Kumar S. (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. Molecular Biology and Evolution. V. 24: P. 1596–1599.
 14. Zakharov I., Shaikevich E. (2013) Comparative study of mtDNA in species of the genus *Adalia* (Coleoptera: Coccinellidae) and the origin of ancient mitochondrial haplotypes in gene pool of *Adalia bipunctata*. European Journal Entomology. V. 110(3): P. 427–433.
- MOLECULAR GENETIC STUDY OF GEOGRAPHIC FORMS OF LADYBIRD BEETLES *ADALIA BIPUNCTATA* AND *A. FRIGIDA***
Zakharov I. A., Shaikevich Ye. V.
- ✿ **SUMMARY: Background:** European ladybird *Adalia bipunctata* has forms with red and black color of the elytra. On the red elytra usually there are two round black spots, on the black — 2–4–6 red spots. *A.b.turanica*, *A.b.revelierei*, *A.b.fasciatopunctata* and *A.frigida* differ from the European *A.b.bipunctata* form by many spots on red or pink elytra. The taxonomic status of these forms is unclear. **Materials and methods:** We studied DNA diversity of the *COI* gene of mtDNA with C1-j-1951 и C1-N-2618 primers (Schulenburg et al., 2002) and ITS2 sequences of rRNA with 5,8S and 28S primers (Proft et al., 1999). The analysis of nucleotide polymorphism from aligned DNA sequences of both *COI* and ITS2 data was done using the MEGA4 software (Tamura et al. 2007). **Results:** 20 variable mtDNA haplotypes in the *COI* gene were found among *A.b.bipunctata*, *A.b.fasciatopunctata*, *A.b.revelierei* and *A.b.turanica*, but none of them was unique to any form. All studied specimens of *A.b.bipunctata*, *A.b.fasciatopunctata*, *A.b.revelierei* and *A.b.turanica*, regardless of mitochondrial haplotype, had almost identical sequences of ITS2. Divergence recorded between species *A.bipunctata* and *A.frigida* is 1.8% in ITS2 and 4.3 % in *COI*. **Conclusion:** *A. b. revelierei*, *A. b. turanica* and *A. b. fasciatopunctata* are geographical variety (or subspecies) of *A. bipunctata*. Based on the differences in the DNA structure, we suggest that *Adalia bipunctata* and *Adalia frigida* are close but distinct independent species.
- ✿ **KEY WORDS:** *Adalia*; polymorphism of populations; mitochondrial DNA; nuclear DNA; adaptation.
- ✿ **REFERENCES (TRANSLITERATED)**
1. Butko E. V. (2005) Jekologija i vnutrividovaja izmenchivost' kokcinellid (Coleoptera, Coccinellidae) v Vostochnom Zabajkal'e [Environmental and intraspecific variation of lady beetles (Coleoptera, Coccinellidae) in East Transbaikalia]. Ph.D. thesis abstract. biol. Sciences. Ulan-Ude. 185 p.
 2. Haag-Liautard C, Coffey N, Houle D, Lynch M, Charlesworth B, et al. (2008) PLoS Biol V. 6 (8): e204. doi:10.1371/journal.pbio.0060204.
 3. Jiggins F.M. (2003) Genetics. V. 164: P. 5–12.
 4. Lus Ya. Ya. (1928) O nasledovanii okraski i risunka u bozh'ih korovok *Adalia bipunctata* L. i *Adalia decempunctata* L. [On the inheritance of color and pattern in lady beetles *Adalia bipunctata* L. and *Adalia decempunctata* L.]. Izvestie Byuro Genetiki, Leningrad. V. 6: P. 89–163 (in Russian, English abstr.).
 5. Lusi(Lus)Ya.Ya.(1973)Taksonomicheskie otnosheniya i geograficheskoe rasprostraneniye form zhukov roda *Adalia Mulsant* [Taxonomic relations and geographic distribution of ladybirds of the genus *Adalia Mulsant*]. Proc. Latvian State Univ. V.184 (1): P. 5–128 (in Russian, English abstr.).

6. Lusi (Lus) Ya.Ya. (1976) O sistematicheskom polo-zhenii *Adalia frigida* Schneider (Coleoptera, Coccinellidae) [On taxonomy of *Adalia frigida* Schneider (Coleoptera, Coccinellidae)]. Genetic and selectional studies in LatSSR. Proc of the Conf. Riga, Zinatne, P. 3–6 (in Russian).
7. Palenko M. V., Mukha D. V., Zakharov I. A. (2004) Izmenchivost' mitohondrial'nogo gena citohromoksidazy I vnutri vida *Adalia bipunctata* i mezhdru vidami zhukov semeystva bozh'i korovki (Coleoptera, Coccinellidae) [Variability of the mitochondrial gene for cytochrome oxidase I within the *Adalia bipunctata* species and within species of ladybird beetles (Coleoptera: Coccinellidae)]. Russian Journal of Genetics. V. 40 (2): P. 205–209.
8. Porter C. H., Collins F. H. (1991) 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. V. 45: P. 271–279.
9. Shaikevich E. V., Ivshina E. V. & Zakharov I. A. (2012) Polimorfizm mitohondrial'noj DNK i rasprostranenie citoplazmaticheskikh simbiotov v populjacijah dvutochehnoj bozh'ej korovki *Adalia bipunctata* [Polymorphism of mtDNA and distribution of cytoplasmic symbionts in populations of the two-spot ladybird beetle *Adalia bipunctata*]. Russian Journal of Genetics. V. 48(5): P. 566–570.
10. Schulenburg J. H., Hurst G. D., Tetzlaff D. et al. (2002) History of infection with different male-killing bacteria in the two-spot ladybird beetle *Adalia bipunctata* revealed through mitochondrial DNA sequence analysis. Genetics. V. 160: P. 1075–1086.
11. Tamura K., Dudley J., Nei M., Kumar S. (2007) Molecular Biology and Evolution V. 24: P. 1596–1599.
12. Zakharov I. A. (1996) Izucheniye nasledovaniya risunka na nadkryl'yakh u *Adalia bipunctata*. [The study of inheritance of elytra pattern in *Adalia bipunctata*]. Russian Journal of Genetics. V. 32 (4): P. 579–583.
13. Zakharov I. A., Shaikevich E. V. (2011) Polimorfizm mtDNK v Peterburgskoj populjaciji *Adalia bipunctata* i ego svjaz' s zarazhennost'ju simbioticheskoj bakteriej Spiroplasma. [An mtDNA polymorphism in the St. Petersburg population of *Adalia bipunctata* and its correlation with infection by the symbiotic bacterium Spiroplasma]. Ekologicheskaya Genetika. V. 9(1): P. 27–31.
14. Zakharov I., Shaikevich E. (2013) Comparative study of mtDNA in species of the genus *Adalia* (Coleoptera: Coccinellidae) and the origin of ancient mitochondrial haplotypes in gene pool of *Adalia bipunctata*. European Journal Entomology. V. 110(3): P. 427–433.

✉ Информация об авторах

Захаров Илья Артемьевич — Советник РАН, член-корр. РАН. Лаборатория генетики насекомых. Институт общей генетики им. Н. И. Вавилова РАН. 119991, Москва, Губкина ул, д. 3. E-mail: iaz@mail.ru.

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

Zakharov Ilya Artemyevich — Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences. Laboratory of insects genetics. Vavilov Institute of General Genetics RAS. 119991, Moscow, Gubkina St., 3, Russia. E-mail: iaz@mail.ru.

Shaikevich Yelena Vladimirovna — Senior researcher, PhD. Laboratory of insects genetics. Vavilov Institute of General Genetics RAS. 119991, Moscow, Gubkina St., 3, Russia. E-mail: elenashaikevich@mail.ru.