

ВИДОВОЙ СОСТАВ И ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ВАРИАбельНОСТЬ БАКТЕРИАЛЬНЫХ СИМБИОНТОВ ТЛЕЙ ФАУНЫ БЕЛАРУСИ

Большинство видов насекомых имеют облигатных и вторичных бактериальных симбионтов, роль которых в жизнедеятельности хозяев невозможно переоценить. У тлей некоторые виды симбиотических бактерий способны повышать термоустойчивость, снижать влияние патогенных организмов и паразитоидов, а также изменять трофические предпочтения хозяев. Другие виды ассоциированы с уменьшением общей массы тела и количества потомства у тлей или оказывают отрицательное влияние на облигатного симбионта — бактерий рода *Buchnera*. В связи с этим симбиотические микроорганизмы представляют существенный интерес для биотехнологии, как возможный инструмент регуляции численности тлей. Наиболее перспективными в этом отношении представляются симбионты рода *Rickettsia* da Rocha-Lima, 1916.

Бактерии рода риккетсия представляют собой обширную группу микроорганизмов, включающую как симбиотические, так и патогенные виды. Видовое разнообразие патогенных микроорганизмов хорошо изучено, поскольку они вызывают ряд тяжелых заболеваний человека. Симбиотические риккетсии, как считается, способны оказывать различное воздействие на жизнедеятельность своих хозяев: влияют на массу тела тлей, количество жизнеспособного потомства и, возможно, ассоциированы с устойчивостью к инсектицидам [2].

Прочность ассоциации тлей со своими симбионтами, факты существования горизонтального переноса генов между бактериями и тлями, позволяют рассматривать тлей как истинных холобионтов, а геном всех сосуществующих организмов — как хологеном. Несмотря на столь важное значение в жизни хозяев, видовое разнообразие симбиотических риккетсий крайне плохо изучено. Целью нашей работы было изучение видового состава вторичных симбионтов тлей, а также оценка генетической однородности симбиотических бактерий рода *Rickettsia*.

Материалы и методы

В работе был использован следующий энтомологический материал (табл. 1, 2):

ДНК выделяли с использованием DNA Purification Kit (Thermo Scientific) из пула особей, адаптировав протокол производителя для работы с тлями. ПЦР провели с использованием родоспецифичных диагностических праймеров, предложенных Т. Tsuchida и соавторами [2].

Состав реакционной смеси составил в 15 мкл: Quick-Load Taq 2X Master Mix (Прайм-тех) — 7,5 мкл, вода — 2,5 мкл, 0,15 мкМ каждого праймера, 2 мкг ДНК. ПЦР проводили в режиме: 95°C — 10 минут, 40 циклов при 95°C — 30 секунд, 55°C — 30 секунд и 72°C — 1 минута, финальная элонгация — 72°C — 5 минут. Электрофоретическое разделение продуктов провели

Таблица 1

Виды тлей, использованные в исследовании

Вид тлей (шифр ваучера)	Вид тлей (шифр ваучера)
<i>Acyrtosiphon caragana</i> Cholodkovsky (14–297)	<i>Brachycaudus prunicola</i> Kaltenbach, 1843 (101–32)
<i>Anuraphis catonii</i> Hille Ris Lambers, 1935 (30–10)	<i>Cholodkovskya viridana</i> Chol., 1896 (14–376–1)
<i>Aphis craccivora</i> Koch, 1854 (14–371)	<i>Drepanosiphum platanoides</i> Schrank (14–300)
<i>Aphis fabae</i> Scopoli, 1763 (25–10)	<i>Dysaphis spp</i> (26–10)
<i>Aphis fabae cirsiacanthoidis</i> Scopoli, 1763 (15–10)	<i>Dysaphis apiifolia petroselini</i> Börn., 1950 (100–89)
<i>Aphis fabae fabae</i> Scopoli, 1763 (43–10)	<i>Dysaphis lappae lappae</i> Koch, 1854 (101–05)
<i>Aphis idaei</i> v.d.Goot, 1912 (21–10–2)	<i>Dysaphis lauberti</i> Börner, 1940 (20–10)
<i>Aphis pomi</i> DeGeer, 1773 (31–10)	<i>Dysaphis ossiannilssoni</i> Stroyan, 1961 (100–78)
<i>Aphis vaccini</i> , Börner, 1940 (36–10)	<i>Impatiensium asiaticum</i> Nevsky, 1929 (51 (1) –11)
<i>Brachycaudus helichrysi</i> Kaltenbach, 1843 (33–10)	<i>Impatiensium asiaticum</i> Nevsky, 1929 (51 (2) –11)

Праймеры, использованные в исследовании

Род симбиотических бактерий	Название праймера	Последовательность праймера 5'–3'	Размер продукта, kb	Ген-мишень
<i>Buchnera</i>	Buch16S1F	GAGCTTGCTCTCTTTGTCGGCAA	0,42	<i>16SrRNA</i>
	Buch16S1R	CTTCTGCGGGTAACGTCACGAA		
<i>Rickettsia</i>	Apis-Ric16SF1	TGGCTGTCGTCAGCTCGT	0,2	<i>16SrRNA</i>
	Apis-Ric16SR1	TTTAGGCTAATGGGTTTTGGTCAT		
	16SA1	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	0,095	<i>gltA</i>
	16SB1	TACGGYTACCTTGTTACGACTT		
<i>Spiroplasma</i>	16SA1	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	0,51	<i>16SrRNA</i>
	TKSSspR	TAGCCGTGGCTTTCTGGTAA		
<i>Regiella</i>	U99F	ATCGGGGAGTAGCTTGCTAC	0,2	<i>16SrRNA</i>
	16SB4	CTAGAGATCGTCGCCTAGGTA		
<i>Hamiltonella</i>	PABSF	AGCACAGTTTACTGAGTTCA	0,2	<i>16SrRNA</i>
	16SB4	CTAGAGATCGTCGCCTAGGTA		
<i>Serratia</i>	16SA1	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	0,48	<i>16SrRNA</i>
	PASScmp	GCAATGTCTTATTAACACAT		

в 1,5% агарозном геле с использованием маркера молекулярного веса GeneRuler DNA Ladder Mix (Thermo Scientific). ПЦП с праймерами к облигатному симбионту тлей рода *Buchnera* использовали в качестве положительного контроля.

Для изучения филогенетического родства бактерий дополнительно использовали 200 нуклеотидных последовательностей генов 16S rRNA и *gltA* бактерий рода *Rickettsia*, симбионтов животных принадлежащих к различным таксонам: 2 типам, 4 классам, 12 отрядам и более чем к 30 родам; а также свободноживущих бактерий родов *Clostridium* и *Lactococcus*. Нуклеотидные последовательности были получены из GenBankNCBI.

Множественное выравнивание нуклеотидных последовательностей провели с использованием алгоритма Muscle, построение филогенетических деревьев осуществили с использованием бутстрэп анализа для 1000 псевдореplik. Расчет парных генетических дистанций провели в программе MEGA 6 [3]. Для статистической обработки данных использовали программу STATISTICA 8, непараметрический метод множественного сравнения средних.

Результаты и обсуждение

В результате проделанной работы было показано, что данная выборка тлей содержала все виды симбиотических бактерий, указанных в табл. 2 (рис. 1). Несмотря на то, что в литературе приводятся данные о том, что бактерии родов *Rickettsia* и *Spiroplasma* встречаются сравнительно редко, однако в нашем исследовании все виды симбиотических бактерий имели высокий процент встречаемости. *Spiroplasma* выявлялась в 90% исследованных образцов. Этот симбионт отсутствовал только в *B. helichrysi*. Симбионты рода *Serratia* также были обнаружены у 90% тлей, за исключением *A. idaei*. Как известно, *Hamiltonella* защищает тлей от паразитических ос и также ассоциирована с адаптацией тлей к повышенным температурам. Встречаемость *Hamiltonella* имела самый низкий процент — 60%. *Hamiltonella* не была обнаружена у таких видов как *M. cholodkovsky*, *B. helichrysi*, *A. vaccinii* и *A. pomi*.

Поскольку бактерии рода *Rickettsia*, как было сказано выше, представляют особый интерес, что связано с их возможной ассоциацией с устойчивостью хозяев к инсектицидам, для



Рис. 1. Электрофореграммы результатов диагностического ПЦП-анализа с тотальной ДНК, выделенной из тлей. Слева: А: *A. catonii*, 1 — *Buchnera*, 2 — *Rickettsia*, 3 — *Regiella*, 4 — *Hamiltonella*, 5 — *Spiroplasma*, 6 — *Serratia*. Б: *A. pomi*, 7 — *Buchnera*, 8 — *Rickettsia*, 9 — *Regiella*, 10 — *Hamiltonella*, 11 — *Spiroplasma*, 12 — *Serratia*. Справа: Электрофореграмма результатов диагностического ПЦП бактерии *Rickettsia* 1, 2, 3 — *B. lychnidis*; 4, 5, 6 — *D. sorbi*

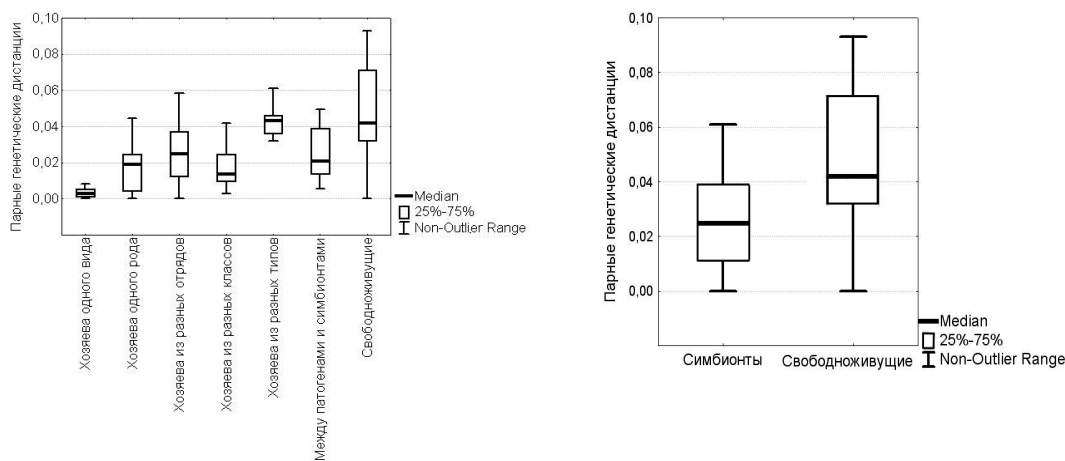


Рис. 2. Сравнительный анализ парных генетических дистанций, рассчитанных по нуклеотидным последовательностям гена 16S rRNA симбиотических и патогенных бактерий рода *Rickettsia*, а также свободноживущих бактерий

уточнения данных по встречаемости риккетсий у тлей мы провели дополнительный диагностический ПЦР одновременно по двум генам риккетсий с положительным контролем — *B. aphidicola* (рис. 2). В результате мы действительно показали, что *Rickettsia* выявляется почти в 100% образцов.

Вторым вопросом, на который мы хотели ответить в рамках исследования, это — являются ли симбиотические риккетсии в филогенетическом отношении достаточно близкими, чтобы их функции, установленные для хозяев одного таксона насекомых, можно было экстраполировать на другие таксоны? В частности, это касалось возможности усиливать устойчивость хозяев к инсектицидам, как это было показано для белокрылок, таксона — родственного тлям. Для анализа генетических различий между отдельными симбиотическими риккетсиями для каждого гена в отдельности были рассчитаны парные генетические дистанции между последовательностями как симбиотических, так и свободноживущих и патогенных бактерий (рис. 2).

Значения генетических дистанций по последовательности 16SrRNA у риккетсий варьировали: у симбионтов от 0 до 0,099, у риккетсий, вызывающих тиф, — от 0 до 0,110. У свободноживущих бактерий варьирование внутриродовых значений генетических дистанций было выше — от 0 до 0,849.

Ожидалось, что у симбиотических бактерий уровень генетической вариабельности будет отличаться от свободноживущих или патогенных видов, в связи с высокоспецифическими

условиями их обитания. Тем не менее, оказалось, что уровень генетической вариабельности симбиотических и патогенных риккетсий соизмеримы. Различия в варьировании генетических дистанций были статистически значимыми между почти всеми группами. В то же время межвидовые генетические дистанции между симбиотическими риккетсиями и свободноживущими видами заметно отличались, причем уровень этих различий также имел высокую статистическую значимость.

Филогенетическое дерево симбиотических риккетсий (67 последовательностей), построенное по гену 16S rRNA, имело 4 кластера с высокими значениями индекса достоверности топологии ветвей (рис. 3).

При этом группирование ветвей происходило не по таксономической принадлежности хозяев. А именно, верхняя часть дендрограммы объединила нуклеотидные последовательности бактерий, чьи хозяева принадлежат не только к различным таксонам членистоногих (Coleoptera, Diptera, Hymenoptera, Hemiptera, Lepidoptera, Neuroptera и др.), но и паукообразных (Trombidiformes, Parasitiformes), а также кольчатых червей. На композитном филогенетическом дереве и дендрограмме по гену *gltA* симбионты из филогенетически близких хозяев также не объединялись, несмотря на высокую статистическую поддержку топологии ветвей. Дендрограмма, построенная на основе последовательностей гена *gltA* (88 последовательностей), так же содержала 4 кластера, однако объединение ветвей происходило иначе, чем на предыдущем филогенетическом дереве.

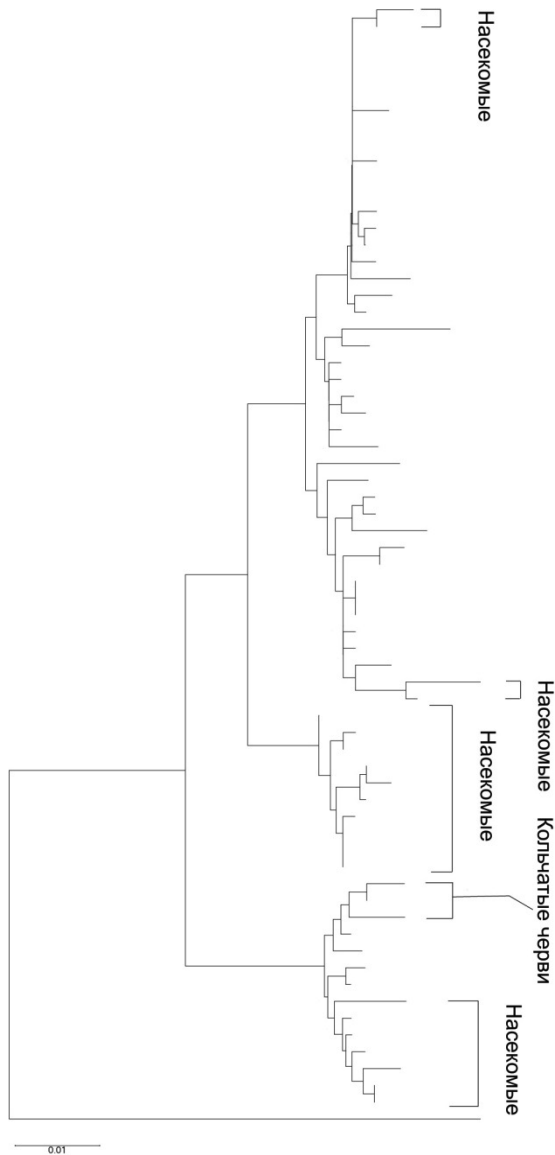


Рис. 3. Филогенетическое дерево, построенное на основе последовательностей гена 16S rRNA симбиотических бактерий рода *Rickettsia*

Принимая во внимание плохую изученность видового разнообразия симбиотических риккетсий, логично предположить, что исходная выборка включала последовательности разных видов (минимум 4) или иных таксономических единиц.

Поскольку и выявленные значения парных генетических дистанций также показали, что различия между отдельными симбионтами одного рода могут быть выше, чем между свободноживущими бактериями разных видов, для дополнительного подтверждения предположения о возможном существовании нескольких самостоятельных видов симбиотических риккетсий мы провели биоинформационный филогене-

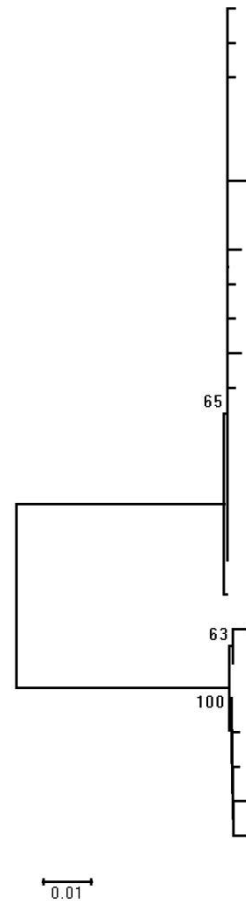


Рис. 4. Филогенетическое дерево, построенное на основе гена 16S rRNA симбиотических риккетсий *Bemisia tabacci*

тический анализ последовательностей гена 16S rRNA риккетсий, выделенных из хозяина одного вида — белокрылки *Bemisia tabacci* (рис. 4). Анализ полученного филогенетического дерева показал, что из хозяев одного биологического вида могут быть выделены риккетсии, генетические различия между которыми соответствуют межвидовому уровню.

Выводы

Изученные тли фауны Беларуси обладают широким спектром симбиотических микроорганизмов. Среди вторичных симбионтов тлей фауны Беларуси почти со 100% частотой встречаются бактерии родов *Rickettsia* и *Spiroplasma*, несмотря на то, что в литературе они указывались как редкие.

Кластеризация симбиотических риккетсий на филогенетических деревьях происходила не в соответствии с таксономической принадлежностью хозяев.

Межвидовые генетические дистанции патогенных видов с установленной видовой принадлежностью оказались ниже, чем симбиотических риккетсий.

С высокой долей вероятности можно заключить, что симбиотические бактерии рода риккетсия принадлежат минимум к 4 различным видам микроорганизмов, и генетически сходные риккетсии могут быть выделены из отдалённых таксонов хозяев. В дальнейшем необходимо уточнить видовую принадлежность и характеристики отдельных представителей симбиотических риккетсий.

Исследование функций симбиотических бактерий в каждом таксоне хозяев необходимо проводить отдельно и независимо от данных, полученных ранее для других групп животных.

Авторы выражают искреннюю благодарность заведующему кафедрой микробиологии, доктору биологических наук, профессору В. А. Прокулевичу за помощь в проведении исследования, заведующему кафедрой зоологии, доктору биологических наук, профессору С. В. Буге и кандидату биологических наук А. В. Стекольникову за любезно предоставленный энтومологический материал.

ЛИТЕРАТУРА

1. Caspi-Fluger A., Inbar M., Mozes-Daube N., Mouton L., Hunter M. S., Zchori-Fein E. Rickettsia 'In' and 'Out': Two Different Localization Patterns of a Bacterial Symbiont in the Same Insect Species // PLoS ONE. — 2011. — 6, № 3. — P. 1–6.
2. Kontsedalov S., Zchori-Fein E., Chiel E., Gottlieb Y., Inbar M., Ghanim M. The presence of Rickettsia is associated with increased susceptibility of Bemisia tabaci (Homoptera: Aleyrodidae) to insecticides // Pest Management Science. — 2008. — 64. — P. 789–792.
3. Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., Kumar S. MEGA 6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0 // Molecular Evolutionary Genetics Analysis [Electronic resource] . — 2013. — Mode of access: <http://www.megasoftware.net>. — date of access: 12.10.2014.

VORONOVA N.V., SIROTKINA D.P.

*Belarusian State University,
Belarus, 220030, Minsk, Nezavisimost ave, 4, e-mail: nvoronova@bsu.by*

SPECIES COMPOSITION AND GENETIC VARIABILITY OF BACTERIAL SYMBIONTS OF APHIDS FROM BELARUS

Aims. Symbiotic bacteria are of interest to biotechnology as potential tool for pest management. The aim of the study was to research the occurrence and diversity of secondary symbionts of specific genera in different species of aphids from Belarus. **Methods.** Biodiversity of bacterial symbionts was studied by PCR with genus-specified primers. Genetic diversity was revealed with methods of bioinformatics. **Results.** The research showed that aphids of Belarusian fauna possess a wide range of symbiotic microorganisms. Among secondary symbionts of Belarusian aphids *Rickettsia* and *Spiroplasma* have almost 100% frequency of occurrence despite the fact in literature they are considered as rare. Degree of the phylogenetic homogeneity of 16S rRNA and *gltA* genes in symbiotic rickettsia has been studied. It is shown that both the mean and the maximum interspecific genetic distances of 16S rRNA gene in pathogenic rickettsia have been significantly lower than in symbiotic ones. Phylogenetic analysis of symbiotic rickettsia, based on 16S rRNA and *gltA* genes, has shown the existence of 4 separate clusters with high bootstrap value. **Conclusions.** The obtained data show possible existence of at least four different species of symbiotic bacteria in *Rickettsia* genus.

Keywords: aphids, symbiotic bacteria, *Rickettsia*, PCR markers.