

Энтомопатогенные нематоды Республики Саха (Якутия): видовой состав и филогенетические отношения

Н.С. Шепелёва

На территории Республики Саха (Якутия) выделены три вида почвенных энтомопатогенных нематод: Steinernema feltiae, S. Kraussei и Heterorhabditis megidis. По результатам филогенетического анализа ITS-участка рибосомальных последовательностей этих нематод выявлены их родственные связи с энтомопатогенными нематодами из других регионов Российской Федерации и сопредельных стран.

Ключевые слова: почвенные энтомопатогенные нематоды, штейнернематиды, гетерорабдитиды, рибосомальные последовательности, филогенетический анализ.

Three species of soil-inhabiting entomopathogenic nematodes were isolated on the territory of the Republic of Sakha (Yakutia): Steinernema feltiae, S. Kraussei and Heterorhabditis megidis. Phylogenetic analysis of ITS-part of ribosomal sequences has revealed relationship of these nematodes with entomopathogenic nematodes isolated in other regions of Russian Federation and neighboring countries.

Key words: soil entomopathogenic nematodes, Steinernematidae, Heterorhabditidae, ribosomal sequences, phylogenetic analysis.

Введение

Почвенные энтомопатогенные нематоды – это представители двух семейств (Steinernematidae – штейнернематиды и Heterorhabditidae – гетерорабдитиды) нематод отряда Rhabditida со сходными особенностями жизненного цикла. Свободно обитающая в почве личинка этих нематод проникает внутрь тела почвообитающих стадий насекомых (личинки двукрылых, перепончатокрылых, жуков и др.) и вносит в полость тела хозяина несколько десятков клеток симбиотических бактерий [1]. Каждому из семейств энтомопатогенных нематод свойственны свои специфичные бактерии: у Steinernematidae – рода *Xenorhabdus* (Thomas and Poinar, 1979), а у рода Heterorhabditidae – *Photorhabdus* (Boemare, Akhurst and Mourant, 1993). Быстро развивающиеся бактерии вызывают септицемию насекомого-хозяина, которое быстро (24–48 ч) погибает. Внутри погибшего насекомого быстро развивающиеся бактерии лизируют все внутренние органы, подавляя за счет выделения антибиотических соединения развитие любой иной микрофлоры [2]. Развивающиеся нематоды питаются самими бактериями и лизированной массой внутренних органов хозяина, производят одно или два поколения (в зависимости от размера насекомого и интенсивности развития самих

нематод) и порождают в результате инвазионных личинок, опять выходящих в почву. Инвазионные личинки энтомопатогенных нематод представляют собой личинки 3-й стадии в кутикулярном чехлике личинок 2-й стадии. Штейнернематиды обычно быстро сбрасывают кутикулу 2-й стадии, тогда как личинки гетерорабдитид сохраняют кутикулу 2-й стадии на весь период обитания в почве и теряют ее лишь в момент проникновения в насекомого-хозяина через межсегментные складки.

Такой своеобразный жизненный цикл сделал энтомопатогенных нематод привлекательным объектом для разработки методов биологического подавления насекомых-вредителей сельского хозяйства. В настоящее время в различных странах на рынке средств защиты растений предлагаются несколько препаратов, имеющих в своей основе живых личинок энтомопатогенных нематод. Эти препараты содержат инвазионных личинок энтомопатогенных нематод разных видов, специализированных к подавлению различных насекомых: почвообитающих личинок двукрылых, личинок жуков, бабочек-плодожорок [3]. Значительный интерес у специалистов, разрабатывающих методы биологического контроля вредителей, вызывают те культуры почвенных энтомопатогенных нематод, которые проявляют активность при особых условиях внешней среды: например, высоких (более 28°C) или низких (менее 15°C) температурах почвы. В связи с этим поиск и выделение

ШЕПЕЛЁВА Надежда Семеновна – аспирант Центра паразитологии, Институт проблем экологии и эволюции РАН, zayac_20@mail.ru.

из почвы энтомопатогенных нематод в регионах с низкими среднегодовыми температурами приобретают и прикладное значение. В данной публикации нами приводятся результаты определения 4 культур почвенных энтомопатогенных нематод, выделенных на территории Республики Саха (Якутия) в 2007–2010 годах.

Методика исследования

Выделение энтомопатогенных нематод методом живых приманок. Почвенные пробы собирали на пеших или автомобильных маршрутах в окрестностях Якутска (2010 г.) и Алдана (2007 г.). Около 1–2 кг грунта из верхних горизонтов (0–15 см) собирали в полиэтиленовый мешок, который плотно закрывали для предотвращения потери почвой влаги. При транспортировке принимали меры для предотвращения нагрева почвы, используя термостатируемый контейнер. Пробы почвы доставляли в лабораторию, где собранную почву разделяли на части объемом 500 мл, для чего почву распределяли (без утрамбовывания!) в пищевые контейнеры соответствующего объема. В почве карандашом делали углубления глубиной 2–3 см, в которые помещали гусениц последнего возраста вошинной моли *Galleria mellonella* (L.). Гусениц получали в процессе лабораторного культивирования на искусственной среде (мед+глицерин+ мука+дрожжевой экстракт). Погибших гусениц выявляли через 5–7 дней периодическими просмотрами. Гусениц с признаками поражения энтомопатогенными нематодами (ровная коричневая или желтоватая (реже темно-серая) окраска без пятен, резинистое внутреннее содержимое трупa насекомого, отсутствие гнилостного запаха от трупa и его содержимого) выкладывали на фильтровальную бумагу в чашки Петри. Бумагу слегка увлажняли для предотвращения потери влаги погибшими гусеницами. При первых признаках миграции нового поколения личинок из трупa насекомого (появление многочисленных движущихся белых личинок на его поверхности) погибших насекомых раскладывали по одному на чашку Петри (обычно пластиковые, диаметром 40 мм), помещенную в контейнер большего размера с тонким слоем воды на дне. Выходящие из насекомого личинки нематод мигрировали на дно контейнера с водой. После 1–2 дней экспозиции суспензию фильтровали на ватном фильтре и хранили в пластиковых флаконах в холодильнике при 4–5°C.

Молекулярно-таксономическое определение энтомопатогенных нематод. Часть суспензии живых инвазионных личинок нематод помеща-

ли в пробирку «Eppendorf» объемом 1,5 мл (общий объем осадка личинок на дне пробирки может быть не более 0,05 – 0,1 мл). Излишнюю воду удаляли тонкой стеклянной пастеровской пипеткой. ДНК из осадка личинок выделяли с помощью колонок Wizard® SV Genomic DNA Purification System по протоколу фирмы «Promega». ПЦР проводили в объеме около 20 мкл с использованием реактивов и по протоколу фирмы «Силекс» – стерильная вода (13,2 мкл), 10x буфер для ПЦР (2 мкл), раствор dNTP (3,2 мкл), Taq полимераза (0,2 мкл) и по 0,25 мкл праймеров AB28 (5'-ATA-TGC-TTA-AGT-TCA-GCG-GGT-3') и TW81 (5'-GTT-TCC-GTA-GGT-GAA-CCT-GC-3'). Пропись ПЦР: первичная денатурация ДНК при 94°C в течение 3 мин, после чего 9 циклов, состоящих из денатурации при 94°C – 1 мин, отжига при 55°C – 1 мин 30 с и элонгации при 72°C – 1 мин 30 с; затем 24 цикла, состоящие из денатурации при 94°C – 45 с, отжига при 57°C – 1 мин и элонгации цепи при 72°C – 1 мин 20 с; после чего финальная элонгация при 72°C в течение 5 мин. Результаты ПЦР реакции проверяли электрофорезом 1 мкл продукта в 1% агарозном геле (100 V, 80–100 mA, приблизительно 30–40 мин).

ПЦР-продукт очищали электрофорезом в 0,8% агарозном геле (полтора часа). Полоску с продуктом вырезали из геля. Извлечение ДНК из агарозных блоков проводили с помощью набора фирмы «Promega» (Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System) по протоколу производителя. Полученную ДНК еще раз очищали преципитацией, добавляя к 200 мкл раствора ДНК 160 мкл 5М раствора ацетата аммония и 1 мл 96% раствора очищенного этанола. После 1 ч инкубации при -70°C осаждали ДНК центрифугированием (13000 об./мин, 15 мин), после чего удаляли надосадочную жидкость и добавляли 700 мкл 80% этанола. После центрифугирования (13000 об./мин, 5 мин) еще раз удаляли надосадочную жидкость, а осадок (не видимый глазу) подсушивали при 37°C в термоблоке «Термит» (15 мин). Ресуспендировали осадок в 20–30 мкл воды и проверяли количество ДНК в геле с помощью спектрофотометра Nanodrop 2000. Секвенирование проводили в ЦКП «Генотех» (бывш. «Геном»), получая результат в виде файлов «ab1», которые читали в программе «Chromas 1.45». Дальнейший анализ последовательностей (построение выравнивания, деревьев, анализ нуклеотидных различий) проводили с использованием программ «Clustal X version 1.81» (Thompson, Gibson, 2000), «Gendoc version 2. 5. 000» и RAUP* 4.0b10. Филогенетический анализ проводили методом максимальной эво-

номии (MP), методом присоединения соседей (NJ) и методом максимального правдоподобия (ML).

Обсуждение результатов

Штейнернематиды

В четырех образцах почвы, собранных в Республике Саха (Якутия), были обнаружены штейнернематиды: а) в пробе, собранной в березняке с примесью ивы близ г. Алдан в 2007 г. Ю.Р. Охлопковым (изолят «Алдан»); б) в пробе из культивируемой огородной почвы близ п. Жатай в 2010 г. (изолят «Жатай»); в) в пробе, взятой на поле под выпасом с плотной дерновиной и высоким содержанием гумуса у аэропорта Маган (изолят «Маган-поле») и г) в пробе (изолят «Маган-березняк»), собранной близ дороги Маган–Якутск в березовом перелеске с покровом из опавших листьев и малым количеством травянистых растений из-за активной роющей деятельности грызунов. Молекулярно-таксономическими методами эти пробы определены как *Steinernema kraussei* (Steiner, 1923) Travassos, 1927 (изолят «Алдан» и изолят «Маган-березняк») и *Steinernema feltiae* (Filipjev, 1934) Wouts, Mráček, Gerdin et Bedding, 1982 (изолят «Жатай» и изолят «Маган-поле»). Оба эти вида широко распространены по всей Го-

ларктике, причем для них отмечена определенная стациальная приуроченность: *S. kraussei* в регионах с умеренным климатом обнаруживаются в основном под пологом леса, тогда как *S. feltiae* чаще выделяют из культивируемой или луговой почвы. На рис. 1 представлены филогенетические связи выделенных в Якутии штейнернематид с другими изолятами этих видов.

На приведенном древе (рис.1) можно видеть, что выделенные в Якутии штейнернематиды образуют в пределах видов *Steinernema feltiae* и *S. kraussei* две обособленные группы. Bootstrap-поддержка единой группы из двух изолятов *S. feltiae* оказывается довольно слабой (71%), тогда как два обнаруженных изолята *S. kraussei* объединяются с довольно сильной поддержкой (95%). Визуальный анализ выравнивания показывает, что якутским *S. kraussei* свойственны несколько характерных нуклеотидных замен, отличающих их от почти всех остальных представителей этого вида. Определенное сходство может быть выявлено лишь с изолятами из Исландии и северной части Великобритании. У якутских *S. feltiae* имеется уникальная нуклеотидная замена в ITS1 rDNA, не отмеченная для каких-либо других изолятов этого вида.

Изучение поверхности инвазионных личинок изолятов «Жатай» и «Маган-поле» показало характерную для вида *S. feltiae* структуру латеральных полей – с 4 ребрами в центральной части поля и 2 маргинальными (краевыми) ребрами приблизительно такой же высоты (рис.2, 3, Ж). Имеются также невысокие субмаргинальные ребра, лежащие между центральными и маргинальными ребрами. Различимость субмаргинальных ребер зависит от ракурса наблюдения. Эти ребра хорошо заметны на поверхности передней части тела личинок (рис.2, Е), поскольку расстояние между маргинальными и центральными ребрами здесь увеличивается.

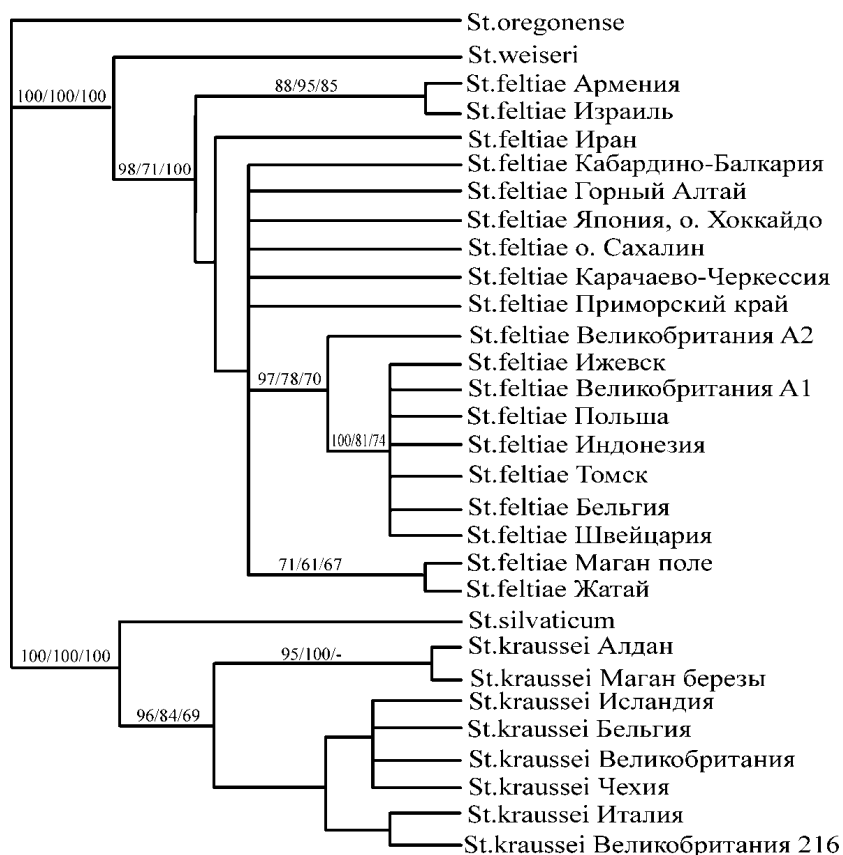


Рис.1. Филогенетические связи изолятов штейнернематид, выделенных в Республике Саха (Якутия). Уровни статистической поддержки ветвей (bootstrap) даны для трех методов анализа в формате MP/NJ/ML

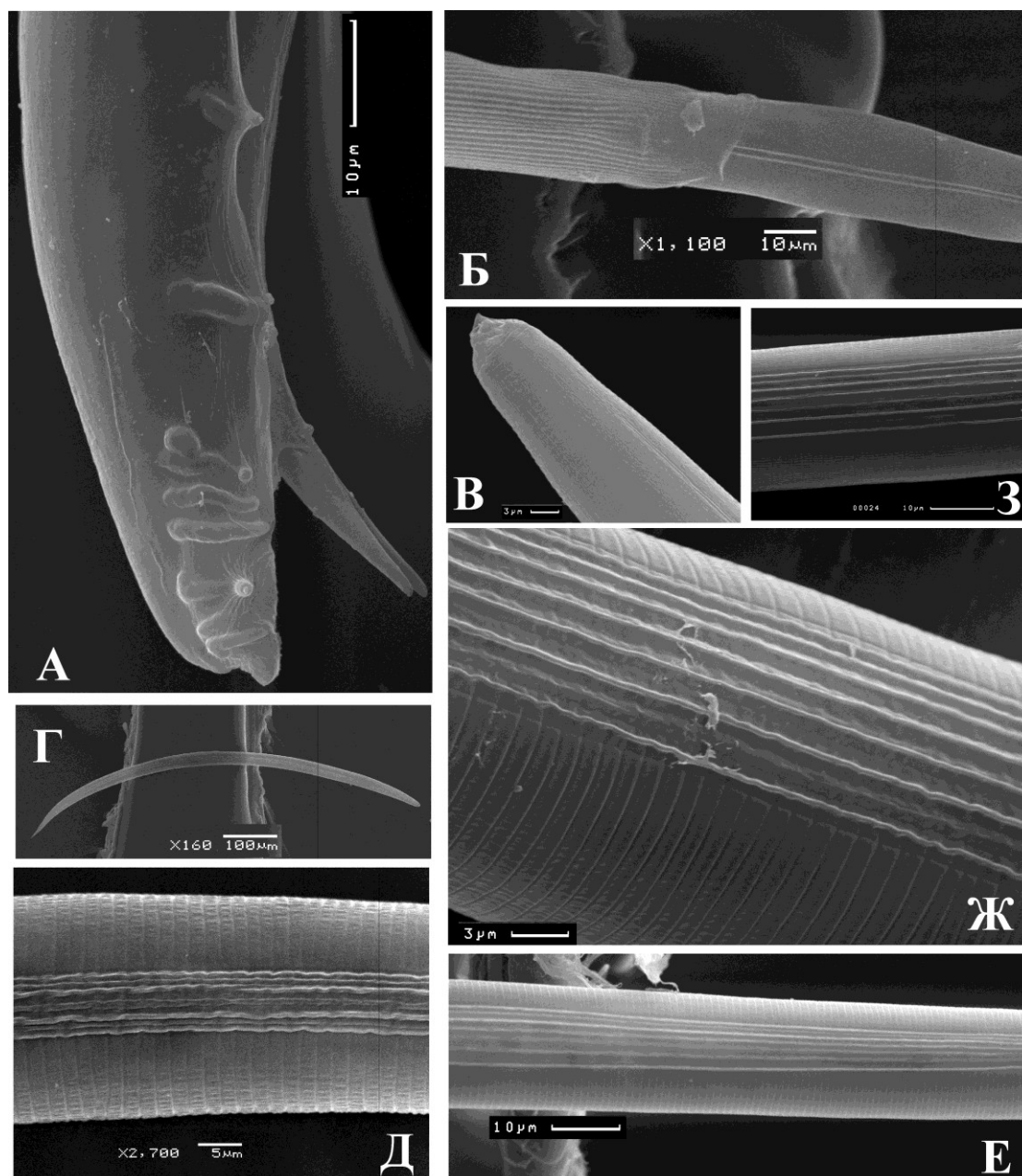


Рис.2. Тонкая морфология поверхности энтомопатогенных нематод, выделенных на территории Республики Саха (Якутия): А–В – *Heterorhabditis megidis*, изолят «Соттинцы»: А – хвостовой конец самца, латерально, Б – передний конец инвазивной личинки в момент сбрасывания кутикулы второй стадии, В – кутикулярный шип инвазивной личинки, используемый для проникновения в насекомое; Г–Д – *Steinernema kraussei* изолят «Маган-березняк»: Г – форма тела инвазивных личинок, Д – строение латерального поля инвазивных личинок; Е–З – якутские *Steinernema feltiae*: Е – латеральное поле инвазивной личинки в передней части тела, изолят «Маган-поле», Ж – латеральное поле той же личинки в средней части тела, З – латеральное поле инвазивной личинки изолят «Жатай». Линейка в микронах

Гетерорабдитиды

Нами на территории этнографического музея в Соттинцах был выделен единственный изолят гетерорабдитид. Выделение произведено из супеси под отдельно стоящими соснами, в непосредственной близости (10–12 м) от крыльца дома-музея в Ленском государственном историко-архитектурном музее-заповеднике «Дружба»

в Соттинцах. Молекулярно-таксономическое определение показало, что этот изолят относится к широко распространенному в Евразии виду *Heterorhabditis megidis*. Филогенетический анализ тремя различными методами (рис.3) показал, что якутские *H. megidis* попадают в большую группу евразийских изолятов, выделенных от Москвы до Якутии. Группа получает существ-

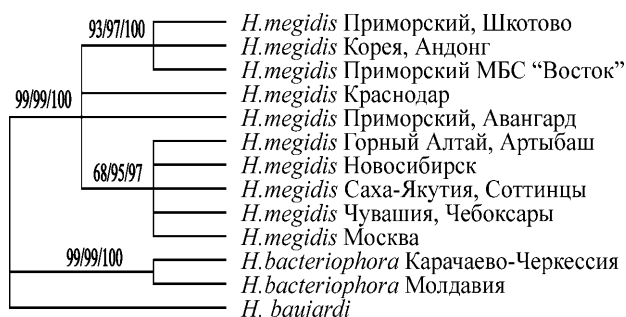


Рис.3. Филетические связи изолята гетерорабдитид, выделенного в Республике Саха (Якутия). Уровни статистической поддержки ветвей (bootstrap) даны для трех методов анализа в формате MP/NJ/ML

венную поддержку по результатам анализа методами присоединения ближайшего соседа и максимального правдоподобия, и лишь метод максимальной экономии дает слабую поддержку этой группы.

Изучение поверхности инвазионных якутских личинок *H. megidis* подтверждает результаты молекулярно-таксономического определения. Поверхность кутикулы 2-й стадии покрыта характерными продольными ребрами, тогда как поверхность личинки 3-й стадии гладкая, но имеющая два продольных кутикулярных ребра латеральной дифференцировки кутикулы (рис.2, Б). Другим характерным признаком инвазионных личинок гетерорабдитид является наличие мощного зуба на головном конце личинок 3-й стадии. Известно, что эта структура используется инвазионными личинками гетерорабдитид для пробурывания покровов насекомых [4]. Дополнительным подтверждением корректности молекулярного определения становится строение хвостового конца самцов якутских *H. megidis* (рис. 2, А) – с характерным расположением генитальных папилл (ребер копулятивной бурс).

Выводы

Ранее для территории Якутии был отмечен единственный вид энтомопатогенных нематод –

Steinernema feltiae, выделенный из почвы аласов [5]. Наши исследования показывают, что видовое разнообразие нематод этой экологической группы на территории Республики Саха (Якутия) выше и здесь встречаются виды энтомопатогенных нематод, широко распространенные по всей лесной части РФ. В то же время молекулярно-филогенетический анализ позволяет обнаружить у якутских изолятов характерные лишь для них нуклеотидные замены. Молекулярно-филогенетический анализ выявил у якутских представителей вида *Steinernema feltiae* только им свойственные нуклеотидные замены. Нуклеотидные последовательности двух изолятов *Steinernema kraussei* из Республики Саха (Якутия) также указывают на их обособленное положение среди других популяций этого вида.

Работа поддержана грантом РФФИ 11-04-00590а.

Литература

1. Martens E.C., Goodrich-Blair H. The *Steinernema carpocapsae* intestinal vesicle contains a subcellular structure with which *Xenorhabdus nematophila* associates during colonization initiation // Cellular Microbiology. – 2005. – V. 7. – P. 1723–1735.
2. Isaacson P.J. and Webster J.M. Antimicrobial activity of *Xenorhabdus* sp RIO (Enterobacteriaceae), symbiont of the entomopathogenic nematode, *Steinernema riobrave* (Rhabditida: Steinernematidae) // Journal of Invertebrate Pathology. – 2002. – 79. – P. 146–153.
3. Gradinarov D. New Natural Hosts of Entomopathogenic Nematodes (Rhabditida: Steinernematidae, Heterorhabditidae) from Bulgaria // Acta zool. bulg. – 2003. – 55 (3). – P. 59–64.
4. Nguyen B. Khuong, Hunt. D. Entomopathogenic nematodes: systematics, phylogeny and bacterial symbionts. // Nematology monographs and respectives. – 2007. – V. 5. – P. 611–692.
5. Иванова Т.С., Данилов Л.Г., Ивахненко О.А. Распространение энтомопатогенных нематод семейств Steinernematidae и Heterorhabditidae в России и их морфологическая характеристика // Паразитология. – 2000. – Вып.34, №4. – С. 323–334.

Поступила в редакцию 01.02.2013