http://www.barcodinglife.org/index.php/TaxBrowser_Home. – Date of access: 04.09.2017.

ВАРИАБЕЛЬНОСТЬ ПЕРЕЧНЯ СИМБИОТИЧЕСКИХ
МИКРООРГАНИЗМОВ У ТЛЕЙ *MACROSIPHUM GEI* КОСН, 1855,
КОЛЛЕКТИРОВАННЫХ С ЧЕТЫРЕХ ВИДОВ КОРМОВЫХ РАСТЕНИЙ

Сироткина Д.П., Воронова Н.В.

Белорусский государственный университет, г. Минск

В работе приводятся результаты исследования связи между перечнем эндосимбионтов тлей модельного вида и кормовым растением.

Введение. Тли (Aphidoidea) – таксон флоэмососущих насекомых, широко распространенных в зоне умеренного климата. Тли используют в качестве кормовых растений большое число культур, в том числе, сельскохозяйственных. Поскольку тли питаются исключительно растительным соком, в процессе эволюции они образовали стойкие симбиотические отношения с разнообразными микроорганизмами. Один из таких микроорганизмов – облигатный симбионт тлей – *Buchnera aphidicola*, восполняющий нехватку азотсодержащих веществ во флоэмном соке растений. Кроме этого, *B. aphidicola* положительно влияет на жизнеспособность потомства тли, участвует в синтезе витаминов и т.д.

Помимо облигатных симбионтов у тлей детектируют вторичных (факультативных) эндосимбионтов. Среди этих микроорганизмов наибольший интерес представляют бактерии родов *Rickettsia*, *Spiroplasma*, *Serratia*, *Hamiltonella* и *Regiella*. Их роль в жизнедеятельности насекомого-хозяина активно изучается. В литературе представлены данные, свидетельствующие о том, что вторичные симбионты участвуют в защите тлей от патогенов и паразитоидов, влияют на термоустойчивость, а для *Acyrtosiphon pisum* было показано, что бактерии рода *Regiella* могут быть ассоциированы с выбором тлей кормового растения [1].

Особый интерес для исследования представляет собой вариабельность перечня симбиотических микроорганизмов среди особей одного вида тлей, так как в литературе не представлено достаточно данных о стабильности спектра эндосимбионтов. Как известно, передача симбиотических микроорганизмов происходит вертикально – от матери к потомству и, в некоторых случаях, горизонтально – с участием паразитоидов или в результате каннибализма. Однако частота горизонтальной передачи симбионтов у тлей значительно ниже, чем вертикальной. Для белокрылок было показано, что горизонтальная трансмиссия симбионтов может осуществляться через кормовое растение, однако у тлей такой механизм до сих пор подтвержден не был [2, 3].

В связи с тем, что на сегодняшний день в литературных источниках представлены неполные данные о возможных путях трансмиссии симбионтов, а влияние симбиотических микроорганизмов на жизнедеятельность тлей не выяснено в полном объеме, изучение симбиотического разнообразия представляет важную исследовательскую задачу. В частности, интересным представляется вопрос о связи между кормовым растением и перечнем симбионтов тли в пределах одного биотопа. В рамках данного исследования был проведен анализ перечня симбиотических микроорганизмов, выявляемых в отдельных особях тлей *Macrosiphum gei* Koch, 1855, ассоциированных с 4 видами кормовых растений. Выбранные растения отличались составом вторичных метаболитов, но произрастали в пределах одного биотопа.

Материалы и методы

Сбор энтомологического материала проводился в период с 2008 по 2016 гг. на территории памятника природы «Дубрава» (Минск, Беларусь). Тли вида *M. gei* были коллектированы с 4 различных растений-хозяев: *Anthriscus sylvestris* (L.) Hoffm., *Geum urbanum* L., *Aegopodium podagraria* L., *Chaerophyllum aromaticum* L. Выделение тотальной ДНК проводили из единичных особей тлей с использованием коммерческого набора «DNA Purification Kit» (Thermo Scientific). Протокол производителя для выделения ДНК из тканей животных был несколько модифицирован: время инкубации образцов в лизирующем буфере было увеличено до 60 мин, объем лизирующего буфера был уменьшен до 50 мкл, количество хлороформа – до 100 мкл; вместо преципитирующего буфера был использован 96 % этанол. Выделенную ДНК растворяли в 30 мкл деионизированной воды.

ПЦР-анализ был проведен с использованием родоспецифичных диагностических праймеров [4], представленных в таблице. Таблица – Родоспецифичные праймеры для получения фрагмента гена 16SrRNA бактерий, использованные в работе

Род симбионтов	Название праймера	Последовательность праймера 5'– 3'	Размер продукта, п.н.
<i>Buchnera</i>	Buch16S1F Buch16S1R	GAGCTTGCTCTCTTTGTCGGCAA CTTCTGCGGGTAACGTCACGAA	420
<i>Rickettsia</i>	ApisRic16SF1 ApisRic16SR1	TGGCTGTCGTCAGCTCGT TTTAGGCTAATGGGTTTTGGTCAT	200
<i>Spiroplasma</i>	16SA1 TKSSspR	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG TAGCCGTGGCTTTCTGGTAA	510
<i>Regiella</i>	U99F 16SB4	ATCGGGGAGTAGCTTGCTAC CTAGAGATCGTCGCCTAGGTA	200
<i>Hamiltonella</i>	PABSF 16SB4	AGCACAGTTTACTGAGTTCA CTAGAGATCGTCGCCTAGGTA	200
<i>Serratia</i>	16SA1 PASScmp	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG GCAATGTCTTATTAACACAT	480

Состав реакционной смеси для ПЦР в 15 мкл включал: 7,5 мкл Quick-LoadTaq 2×MasterMix (Праймтех), 2,5 мкл воды, 0,15 мкМ каждого праймера, 2 мкг ДНК. ПЦР проводили в режиме: начальная денатурация при 95 °С – 10

мин., 40 циклов 95 °С – 30 сек., 55 °С – 30 сек. и 72 °С – 1 мин., финальная элонгация – 72 °С – 5 мин. Электрофоретическое разделение продуктов провели в 1,5 % агарозном геле с использованием маркера молекулярного веса «GeneRuler DNA Ladder Mix» (Thermo Scientific), а также ДНК маркеров молекулярного веса М1Кб и М100bp (Праймтех). Детектирование результатов провели на основе наличия либо отсутствия на электрофореграмме фрагмента необходимой длины. Специфичные праймеры к 16S рРНК облигатного симбионта тлей *B. aphidicola* были использованы в качестве положительного контроля качества ПЦР. Статистическая обработка данных была проведена в программе STATISTICA. Для определения статистической значимости полученных результатов были построены таблицы сопряженности и рассчитан критерий χ^2 .

Результаты

Для изучения связи между перечнем симбионтов у тлей *M. gei* и питанием на конкретном кормовом растении был проведен скрининг симбиотических микроорганизмов в 91 особи тлей (с бутеня ароматного – 24 особи, со сныти обыкновенной – 22 особи, с купыря лесного – 24 особи, с гравилата городского – 21 особь). В ходе исследования оказалось, что симбиотические микроорганизмы имели различную встречаемость: чаще всего были детектированы бактерии рода *Regiella* – в 79 из 91 особи, реже всего обнаруживались бактерии рода *Serratia* – в 7 особях из 91 (в качестве примера результатов диагностического ПЦР-анализа на рисунке 1 представлены электрофореграммы ПЦР-продуктов, полученных при работе с образцами тлей, собранных на бутене ароматном и купыре лесном).

Низкая встречаемость была также отмечена у бактерий родов *Rickettsia* и *Spiroplasma*, а именно, у 9 и 10 особей соответственно из 91 исследованной были детектированы симбионты данных родов. Симбиотические бактерии рода *Hamiltonella* присутствовали в 16 образцах.

Тля с бутеня ароматного: 1 – *Buchnera*, 2 – *Rickettsia*, 3 – *Regiella*, 4 – *Hamiltonella*, 5 – *Spiroplasma*, 6 – *Serratia*. Тля с купыря лесного: 7 – *Buchnera*, 8 – *Rickettsia*, 9 – *Regiella*, 10 – *Hamiltonella*, 11 – *Spiroplasma*, 12 – *Serratia*

Рисунок 1 – Электрофореграмма результатов диагностического ПЦР-анализа общей ДНК, выделенной из тлей *Macrosiphum gei*

Стоит отметить, что 9 особей из 91 не содержали ни одного из рассматриваемых вторичных симбионтов, однако первичный симбионт – *V. aphidicola*, был детектирован во всех исследованных особях.

Информация о встречаемости симбиотических микроорганизмов в выборке представлена на рисунке 2.

Рисунок 2 – Встречаемость эндосимбионтов различных родов у тлей
Macrosiphum gei

Для оценки наличия либо отсутствия связи между встречаемостью эндосимбионта конкретного рода и кормовым растением тли была построена таблица сопряженности и посчитан критерий χ^2 для качественных данных (наличие/отсутствие симбиотического микроорганизма у каждой из исследованных особей тли). В результате статистической обработки данных отвергнуть нулевую гипотезу об отсутствии различий в перечне симбионтов между тлями с разных кормовых растений не удалось. Оказалось, что встречаемость каждого из эндосимбионтов на конкретном кормовом растении у тлей *M. gei* соответствовала ожидаемому значению, рассчитанному для генеральной совокупности. Несмотря на встречающиеся в литературе данные об ассоциации некоторых эндосимбионтов тлей с выбором насекомым конкретного кормового растения [1], полученные нами результаты не позволяют предположить наличие такого рода связи.

Полученные данные об отсутствии связи между наличием симбиотических микроорганизмов у тлей *M. gei*, коллектированных на территории Беларуси, и кормовым растением, а также вариабельность перечня симбионтов в пределах одного вида тли может свидетельствовать о том, что симбиотический спектр отдельных особей тлей определяется случайными причинами. В связи с этим вопрос о возможных путях попадания симбионта в организм насекомого-хозяина остается открытым.

Исследование выполнено при поддержке гранта, выделенного Министерством образования Республики Беларусь, докторантам, аспирантам и студентам в 2017 г.

Список литературы:

1. Facultative symbionts in aphids and the horizontal transfer of ecologically important traits / K. M. Oliver [et al.] // Annual Review of Entomology. – 2010. – Vol. 55, N. 1. – P. 247–266.
2. Faithful vertical transmission but ineffective horizontal transmission of bacterial endosymbionts during sexual reproduction of the black bean aphid, *Aphis fabae* / K. Vorburger [et al.] // Ecological Entomology. – 2017. – Vol. 42, N. 2. – P. 202–209.
3. Horizontal transmission of the insect symbiont *Rickettsia* is plant-mediated / A. Caspi-Fluger [et al.] // Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences. – 2012. – Vol. 279, N. 1734. – P. 1791–1796.
4. Facultative bacterial endosymbionts of three aphid species, *Aphis craccivora*, *Megoura crassicauda* and *Acyrtosiphon pisum*, sympatrically found on the same host plants / T. Tsuchida [et al.] // Appl. Entomol. Zool. – 2006. – Vol. 41, N. 1. – P. 129–137.

БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ВТОРИЧНЫХ МЕТАБОЛИТОВ РАСТЕНИЙ *VIDENSFRONDOSUS* L.- ИНВАЗИВНОГО ВИДА ВО ФЛОРЕ БЕЛАРУСИ

Скуратович Т.А.¹, Молчан О.В.¹, Голенченко С.Г.²

¹ ГНУ «Институт экспериментальной ботаники им. В.Ф. Купревича НАН Беларуси», г. Минск, tskuratovich@yandex.ru

² Белорусский государственный университет, г. Минск

*Установлено, что экстракты череды олиственной оказывают антибактериальную активность относительно *Staphylococcus aureus* 6538, *Staphylococcus aureus* 25923, *Enterococcus faecalis* 29212 и фунгистатическое действие в отношении фитопатогенных грибов *Fusarium avenaceum*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Botrytis cinerea*. Биологическая активность находится в соответствии с содержанием суммы фенольных соединений в экстрактах.*