

**МОЛЕКУЛЯРНО-ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ
ЭНТОМОПАТОГЕННЫХ НЕМАТОД *STEINERNEMA
KRAUSSEI* ИЗ ОКРЕСТНОСТЕЙ БИОСТАНЦИИ «РАДУГА»
В НИЖНЕМ ТЕЧЕНИИ РЕКИ КАМЧАТКИ**

С. Э. Спиридонов

*Центр паразитологии, ФГБУН Институт проблем экологии и
эволюции (ИПЭЭ) им. А. Н. Северцова РАН, Москва*

**MOLECULAR-PHYLOGENETIC ANALYSIS
OF ENTOMOPATHOGENIC NEMATODES *STEINERNEMA
KRAUSSEI* FROM THE VICINITIES OF “RADUGA”
BIOLOGICAL STATION NEAR KAMCHATKA RIVER
ESTHUART**

S. E. Spiridonov

*Center of Parasitology, Severtsov's Institute of Ecology
and Evolution (IEE), RAS, Moscow*

К почвенным энтомопатогенным нематодам относятся представители двух семейств нематод отряда Rhabditida (сем. Steinernematidae и сем. Heterorhabditidae), имеющие сходный жизненный цикл. В почве обитают их личинки, способные проникать внутрь и убивать насекомых, внося в гемоцель последних особые бактерии, находящиеся в симбиотической связи с нематодами. Интерес к этим нематодам связан в первую очередь с их использованием в качестве агентов биологического метода борьбы с насекомыми-вредителями. Энтомопатогенные нематоды становятся также удобным объектом для популяционных и биогеографических исследований, поскольку накоплен значительный объем информации по их нуклеотидным последовательностям.

В июле 2014 г. в окрестностях биостанции «Радуга» ИБМ ДВО РАН им. А. В. Жирмунского, находящейся в нижнем течении реки Камчатки (на протоке из озера Азабачьего; территория Усть-Камчатского муниципального района), было собрано 86 почвенных проб объемом около 1 л. В контейнер с почвой добавляли по 5 гусениц последнего возраста большой вошинной моли *Galleria mellonella* и оставляли в прохладном месте на 3–6 дней. После такой выдержки почву высыпали в кювету и отбирали погибших насекомых. Насекомые были доставлены в лабораторию в Москве, где по прошествии 1–2 недель из погибших гусениц вышли многочисленные инвазионные личинки нематод. Нематод просматривали под биноклем для выявления по морфологическим

признакам именно энтомопатогенных нематод. Вышедших сапробиотических нематод выбрасывали, а из энтомопатогенных нематод фильтрованием через ватный фильтр получали очищенные суспензии для хранения при 4–6 °С. ДНК из части суспензии живых личинок выделяли с помощью колонок Promega (Wizard® Genomic DNA Purification Kit). ITS-участок рибосомальной ДНК амплифицировали с помощью праймеров TW81 5'-GTTTCCGTAGGTGAACCTGC-3' и AB28 5'-ATATGCTTAAGTTCAGCGGGT-3' (Joyce et al., 1994). Полученные ПЦР продукты очищали в геле и с помощью преципитации этанолом в присутствии ацетата аммония, затем отправляли для прямого секвенирования (т. е. с теми же праймерами) в ЦКП «Генотех». Полученные хроматограммы читали с помощью программы Chromas 1.45. Для сравнительного анализа использовали все имеющиеся на данный момент в ГенБанке NCBI сходные последовательности, которые выявляли с помощью опции BLAST (Altshul, et al., 1990). Выравнивания получали и редактировали (обрезали фланкирующие участки) с помощью программы ClustalX 1.81 и Genedoc, после чего анализировали с помощью программы PAUP 4b10 (Swofford, 1998), используя алгоритм максимальной экономии (maximum parsimony).

Близ биостанции «Радуга» было выделено две культуры энтомопатогенных нематод. Одна из них – на берегу оз. Азабачьего (Камчатка 1), другая – на склоне (Камчатка 4), прямо над станцией. BLAST-поиск в ГенБанке NCBI показал, что по последовательностям ITS-участка рибосомальной ДНК эти нематоды относятся к виду *Steinernema kraussei* (Steiner, 1923) Travassos, 1927. Проведенный филогенетический анализ взаимоотношений выделенных на Камчатке культур с другими популяциями этого вида свидетельствует, что камчатские культуры *Steinernema kraussei* по нуклеотидному составу ITS-участка полностью совпадают с представителями этого же вида из Японии (последовательность, депонированная как AB243442). Также близкой оказывается и последовательность *Steinernema kraussei*, выделенных нами в 2002 г. на берегу Телецкого озера на Алтае (AY171271). Наличие в последовательности «Камчатка 1» вставки из шести Т-нуклеотидов приводит к ее обособлению в филограмме. В то же время, даже с учетом этой вставки, уровень различий между этими четырьмя близкими культурами невелик и составляет не более 9 нуклеотидов (таблица).

Изучение полученной филограммы показывает, что ITS-участок рибосомальных последовательностей оказывается достаточно информативным для выявления внутривидовых групп в виде *Steinernema kraussei*, а также определения филетических связей этого вида (рисунк).

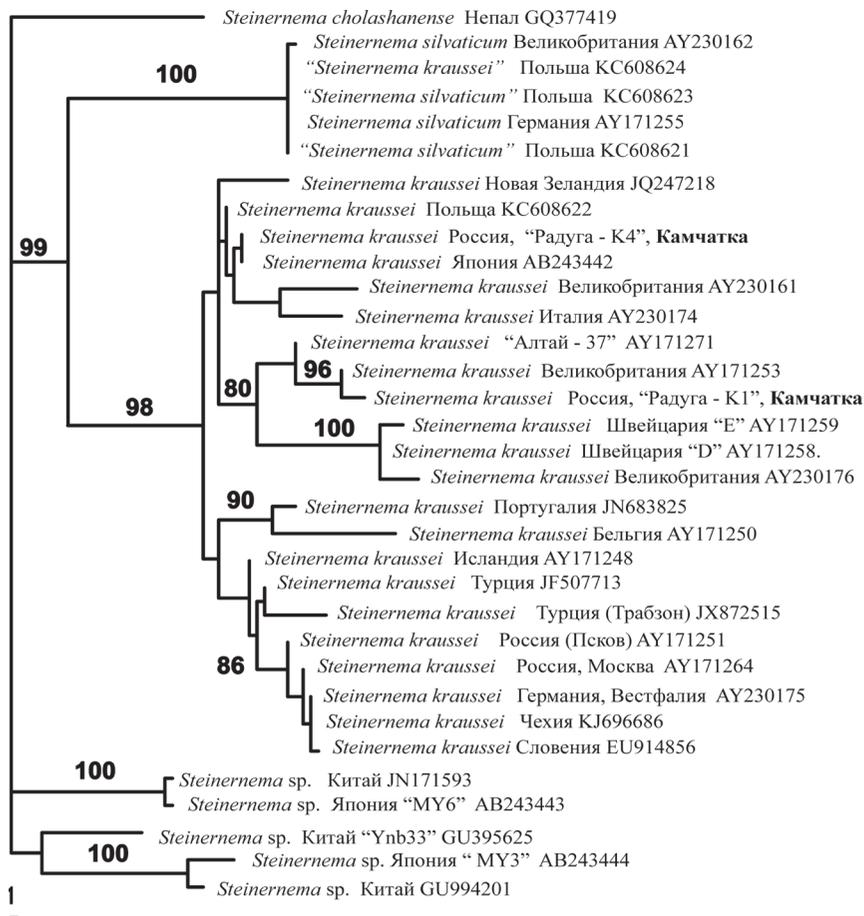
Нуклеотидные различия между камчатскими *S. kraussei* и другими
представителями этого вида

Вид нематоды	1	2	3	4
1. <i>Steinernema kraussei</i> Япония АВ243442	–	3	6	0
2. <i>Steinernema kraussei</i> Алтай АУ171271	3	–	9	3
3. <i>Steinernema kraussei</i> Камчатка 1	0	3	–	6
4. <i>Steinernema kraussei</i> Камчатка 4	0	3	0	–

Примечание: Ниже диагонали показаны абсолютные различия (число различающихся нуклеотидов) между сравниваемыми популяциями нематод по результатам анализа в PAUP 4b10. Выше диагонали – различия с учетом poly-T вставки у изолята «Камчатка 1».

Из филограммы видно, что ближайшим видом к *Steinernema kraussei* является вид *S. silvaticum*. В пределах вида *S. kraussei* выявляются несколько хорошо поддерживаемых географических групп из 2–5 видов (центрально-европейская, турецкая). Присутствуют также существенно отличающиеся от других группы популяций, выделенных на значительном удалении друг от друга (Великобритания–Италия; Бельгия–Португалия). Приходится также заметить, что депонированные недавно как *Steinernema kraussei* польскими авторами три последовательности (КС608621, КС608623 и КС608624) относятся к виду *S. silvaticum*.

Полное совпадение довольно изменчивых по своей природе ITS-участков рибосомальных последовательностей указывает на факт явного генетического родства между популяциями энтомопатогенных нематод. Хотя мы не представляем в настоящий момент, каким образом эти патогены почвенных насекомых могут распространяться на большие расстояния, сам факт такой идентичности несомненно указывает на сравнительно недавний перенос. Возможно, большего внимания заслуживает замечание одного из пионеров изучения энтомопатогенных нематод Проспера Бовьена (Bovien, 1937) о возможности временной приостановки развития нематод-патогенов при переходе двукрылого-хозяина из личиночной стадии в имагинальную. В таком случае летающее насекомое успевает до момента гибели перенести нематод на значительные расстояния. В отличие от некоторых других видов рода (*Steinernema feltiae*, *S. carpocapsae*) *S. kraussei* редко присутствует в обрабатываемой почве сельскохозяйственных угодий, и роль человека в разное отдельных гаплотипов этой нематоды, по видимому, незначительна.



Филограмма взаимоотношений между двумя выделенными на Камчатке изолятами нематод *Steinerema kraussei* и другими представителями рода *Steinerema*. У соответствующих узлов показаны значения bootstrap-поддержки (если выше 80 %). Длина ветви отражает нуклеотидные различия. Линейка – 1 нуклеотид.

ЛИТЕРАТУРА

- Altschul S., Gish W., Miller W., Myers E., Lipman D. 1990. Basic local alignment search tool // Journal of Molecular Biology Vol. 215. N 3. P. 403–410.
- Bovien P. 1937. Some types of association between nematodes and insects // Videnskabelige Meddeleser Fra Dansk Naturhistorisk Forening Kobenhaven. N 101. P. 1–114.

Joyce S. A., Burnell A. M., Powers T. O. 1994. Characterization of *Heterorhabditis* isolates by PCR amplification of segments of mtDNA and rDNA genes // J. Nematol. Vol. 26. P. 260–270.

Spiridonov S. E., Reid A. P., Podrucka K., Subbotin S. A., Moens M. 2004. Phylogenetic relationships within the genus *Steinernema* (Nematoda: Rhabditida) as inferred from analyses of sequences of the ITS1–5.8S-ITS2 region of rDNA and morphological features // Nematology. Vol. 6. N 4. P. 547–566.

Swofford D. L. 1998. PAUP, phylogenetic analysis using parsimony and other methods. Version 4. // Sunderland, Massachusetts, Sinauer Associates. 128 p.