

Диагностика сибирских популяций непарного шелкопряда
(*Lymantria dispar*) на заражённость внутриклеточным
симбионтом *Wolbachia*

The screening of *Wolbachia* infection in gypsy moth
(*Lymantria dispar*) populations in Siberia

В.В. Мартемьянов*, М.А. Юдина**, И.А. Белоусова*,
Р.А. Быков**, Ю.Ю. Илинский**, ***, ****
V.V. Martemyanov*, M.A. Iudina**, I.A. Belousova*,
R.A. Bykov**, Yu.Yu. Ilnsky**, ***, ****

* Институт систематики и экологии животных СО РАН, ул. Фрунзе 11, Новосибирск 630091 Россия. E-mail: martemyanov79@yahoo.com, puza.ia@mail.ru.

* Institute of Systematics and Ecology of Animals, Russian Academy of Sciences, Siberian Branch, Frunze Str. 11, Novosibirsk 630091 Russia.

** Институт цитологии и генетики СО РАН, пр. акад. Лаврентьева 10, Новосибирск 630090 Россия. E-mail: maryjudina@gmail.com, bykovra@bionet.nsc.ru, paulee@bionet.nsc.ru.

** Institute of Cytology & Genetics SB RAS, Acad. Lavrentyev Ave. 10, Novosibirsk 630090 Russia

*** Новосибирский Государственный Университет, ул. Пирогова 2, Новосибирск 630090 Россия.

*** Novosibirsk State University, Pirogova Str. 2, Novosibirsk 630090 Russia.

**** Балтийский федеральный университет им. И. Канта, ул. А. Невского 14, Калининград 236041 Россия.

**** Baltic Federal University Immanuel Kant. A. Nevskogo Str. 14, Kaliningrad 236041 Russia.

Ключевые слова: непарный шелкопряд, *Lymantria dispar*, *Wolbachia*, Западная Сибирь, популяция, заражённость.

Key words: gypsy moth, *Lymantria dispar*, *Wolbachia*, Western Siberia, population, infection.

Резюме. В работе проведена диагностика сибирских популяций непарного шелкопряда на заражённость внутриклеточным симбионтом *Wolbachia* с использованием ПЦР. Среди проанализированных насекомых инфицированных особей не выявлено. Обсуждаются перспективы искусственного инфицирования популяций шелкопряда для контроля численности фитофага.

Abstract. The *Wolbachia* infection was examined in gypsy moth individuals that were collected in Siberian populations. There were no *Wolbachia* infected samples in our collection and we came to the conclusion based on our and other reports that *Lymantria dispar* had no *Wolbachia* infection in other regions. We discuss the perspectives of using a *Wolbachia*-transinfected gypsy moth line to control population size of pest.

Введение

Непарный шелкопряд (*Lymantria dispar* L.) — вид чешуекрылых надсемейства Noctuidea, современный ареал которого приходится, главным образом, на территорию умеренных широт Палеарктики от Японии до Европы, и Неарктики, куда он попал в конце 19 века из Франции [Liebhold et al., 1989]. Личиноч-

ная стадия непарного шелкопряда является одним из наиболее значимых вредителей лесного хозяйства в мире. Этот вид способен формировать очаги массового размножения практически по всему ареалу и наносит вред более 500 видам древесных растений [Ильинский, Тропин, 1965; Qian, 2000].

В отношении непарного шелкопряда ведётся разработка биологических методов борьбы, среди которых рассматривается применение биопрепаратов на основе энтомопатогенов грибной (энтомофторовые грибы), вирусной (бакуловирусы) и бактериальной (*Bacillus thuringiensis*) природы [van Frankenhuyzen et al., 2007]. Известно, что многие микроорганизмы, а также паразитические энтомофаги, способны регулировать численность фитофагов в природе. Одним из потенциальных регуляторов численности вредителей может служить бактерия *Wolbachia* — эндосимбионт, широко распространённый среди членистоногих и некоторых нематод. По современным оценкам, более половины всего современного видового разнообразия насекомых может быть инфицировано этой бактерией [Hilgenboecker et al., 2008; Zug, Hammerstein, 2012]. Этот симбионт хоть и не является непосредствен-

ным патогеном насекомых, благодаря способности индуцировать половые аномалии в популяции хозяйина может быть использован для регуляции численности и половой структуры популяций насекомых. Так, известно четыре феномена индуцируемых *Wolbachia* у вида-хозяйина: цитоплазматическая несовместимость, телитокный партеногенез, андроцид и феминизация [Weggen, 1997]. Явление цитоплазматической несовместимости может быть использовано для регуляции неинфицированных природных популяций, когда интродукция инфицированных самцов приводит к формированию нежизнеспособного потомства [Bourtzis, 2008]. Таким образом, для правильного планирования мер борьбы с вредителем необходимо иметь точные сведения о степени заражённости насекомых этим эндосимбиотом. Однако, несмотря на большой интерес и высокую степень изученности, как непарного шелкопряда, так и бактерии *Wolbachia*, исследований заражённости *L. dispar* этим эндосимбиотом практически не проводилось. Единственная работа, которая косвенно затрагивала этот вопрос — это работа японских исследователей, которые оценили заражённость всего пяти яйцекладок из двух японских популяций *L. dispar* [Higashiura et al., 2011]. Исследователи не обнаружили присутствие бактерий *Wolbachia* в хозяине.

В нашем исследовании мы проверили три репрезентативные выборки из сибирских популяций *L. dispar* L. на предмет инфицированности эндосимбиотической бактерией *Wolbachia* с целью определения перспектив использования данного симбионта для управления структурой и численностью популяций непарного шелкопряда.

Материалы и методы

Основной сбор *L. dispar* осуществлялся в первой декаде сентября 2014 г. на стадии диапаузирующих гусениц первого возраста внутри хорионов яиц. Сбор проводили в трёх точках юга Западной Сибири: 1) 53°91' N, 77°77' E; 2) 53°75' N, 78°15' E; 3) 53°98' N, 78°87' E. Удалённость точек сбора друг от друга составляла 50–100 км. Яйцекладки собирались в берёзовых насаждениях в период, когда популяции шелкопряда находились в эруптивной фазе динамики численности; всего 90 яйцекладок, по 30 из каждой популяции. Кроме того, из сборов 2013 г. были проанализированы 4 яйцекладки, а также органы и части тела 10-ти личинок старших возрастов: головная капсула, зачатки гонад, жировое тело, кишечник, мальпигиевы сосуды, поскольку для *Wolbachia* характерен тканевой тропизм. Каждый образец яйцекладки включал 15–35 диапаузирующих личинок первого возраста. Из каждого образца (суммарно 104 индивидуума: 10 личинок старшего возраста и яйцекладки, потомство 94 самок) была выделена тотальная ДНК общепринятым методом [Marmur, 1961] с модификациями. Яйцекладки гомогенизировали в 200 мкл, а отдельные органы — в 200–1200 мкл (в зависимости от объема материала) экстрагирующего буфера (10 mM TRIS-HCl (pH 8.0), 25 mM ЭДТА, 0,5 % SDS, 0,1 M NaCl) и инкубировали при +56 °C в

течение 2 часов. После преципитации ДНК растворяли в 100 мкл бидистиллированной воды. Все образцы проверялись на качество для ПЦР посредством амплификацией тотальной ДНК с универсальными для насекомых праймерами к гену *28SrRNA* (28sF3633 5'TACCGTGAGGGAAAGTTGAA-A-3', 28sR4076 5'AGACTCCTTGGTCCGTGTTT-3'). Факт инфицированности устанавливался на основе амплификации ДНК со специфичными праймерами к рибосомальному гену *Wolbachia 16S rRNA* (W-Specf 5'-CATACCTATTTCGAAGGATAG-3', W-Specf 5'-AGCTTCGAGTGAAACCAATTC-3'). В качестве положительного контроля использовалась ДНК инфицированных линий *Drosophila melanogaster* Meigen (Diptera: Drosophilidae) Bi90w и w1118 и инфицированного образца *Leptidea sinapis* L. (Lepidoptera: Pieridae); в качестве отрицательного — ДНК лабораторной культуры *Galleria mellonella* L. и ДНК образцов *Bruchus pisorum* L. (Bruchidae, Curculionoidea). Реакционная смесь, общим объёмом 20 мкл, содержала 2 мкл буфера (Медиген, Новосибирск), 2 мкл dNTP (0,8 mM), 2 мкл MgCl₂ (3,0 mM), по 4 мкл каждого праймера (0,3 mM), 0,5 ед. ак. Таq-полимеразы. Условия ПЦР: 40 циклов, первичная денатурация +94 °C 2 мин., затем +94 °C 30 с. в каждом цикле, отжиг праймеров: +54 °C — 50 с. для *28S rRNA* и +55 °C — 45 с. для *16S rRNA*; элонгация 1,5 мин. Ампликоны визуализировались в 1,5 % агарозном геле.

Результаты и обсуждение

В нашем исследовании осуществлён скрининг популяционных сборов непарного шелкопряда (всего 104 особи) на присутствие эндосимбиотической бактерии *Wolbachia*. Известно, что при размере выборки 100 и более образцов вероятность обнаружения данного эндосимбионта значительно возрастает [Hilgenboecker et al., 2008]. Разрешающая способность нашего популяционного анализа определяется на уровне 3 % (30 особей — популяция / 100 %). Мы не нашли ни одного *Wolbachia*-позитивного образца среди 94 яйцекладок и 10 личинок старших возрастов непарного шелкопряда. Таким образом, популяции непарного шелкопряда Новосибирской области либо свободны от эндосимбионта *Wolbachia*, либо доля инфицированных особей в популяции не превышает уровня 3 %.

Учитывая результаты нашей работы, отсутствие информации об эндосимбионте *Wolbachia* в других популяциях непарного шелкопряда (Higashiura et al., 2011), а также геногеографию непарного шелкопряда, мы приходим к выводу, что вероятность обнаружения *Wolbachia* в природных популяциях данного вида крайне низка. Поскольку *Wolbachia* является матерински наследуемым симбиотом, она наследуется с митохондриями, что приводит к коэволюционным изменениям этих факторов [Hurst, Jiggins, 2005]. По результатам анализа митохондриальной наследственности непарного шелкопряда описано четыре гаплотипические группы, две из которых строго приурочены к территории Японии, одна характерна для обширной территории Азии и восточной

Европы, и последняя, характеризующаяся низким гаплотипическим разнообразием, описана для Западной Европы, Северной Африки и Северной Америки. Таким образом, для проверки статуса инфицированности непарного шелкопряда необходимо исследовать популяции, принадлежащие всем четырём гаплотипическим группам. Японские популяции были тестированы посредством двух методов: ПЦР и флуоресцентной микроскопии [Higashiura et al., 2011], все особи были свободны от симбионта. Азиатская линия материнской наследственности проверена в нашей работе. Данные о *Wolbachia* в западных популяциях отсутствуют. Однако, учитывая высокий интерес как к непарному шелкопряду, как одному из наиболее опасных вредителей, так и к *Wolbachia*, можно предположить, что отсутствие информации связано лишь с тем, что отрицательный результат исследователи публикуют значительно реже.

Несмотря на наличие строгой вертикальной передачи бактерий *Wolbachia*, в литературе описана принципиальная возможность искусственного горизонтального переноса бактерий от особи к особи [Boyle et al., 1993; Poinot et al., 1998; Zabalou et al., 2004; Xi et al., 2005]. Линии непарного шелкопряда, искусственно инфицированные *Wolbachia*, могут быть использованы в прикладных исследованиях. Впервые, инфицирование непарного шелкопряда определённым штаммом *Wolbachia* и интродукция инфицированных самцов в естественные популяции может привести к явлению цитоплазматической несовместимости и значительному снижению численности локальной популяции [Bourtzis, 2008]. Во-вторых, интродукция симбиотических бактерий в естественные популяции может увеличить частоту возникновения спонтанных бакуловирусных эпизодов, что было показано на других видах чешуекрылых [Graham et al., 2012]. Кроме того, управление половой структурой популяции непарного шелкопряда может быть использовано в биотехнологическом процессе производства энтомопатогенов. Так, из четырёх описанных для *Wolbachia* механизмов манипуляции репродукцией хозяина, три (андроцид, телитокный партеногенез и феминизация) приводят к сдвигу соотношения полов в сторону преобладания самок. Использование в биотехнологической промышленности популяций, представленных преимущественно самками, может существенно увеличить эффективность производства облигатных энтомопатогенов (вирусы, энтомофторовые грибы), т.к. самки вдвое больше самцов и продуцируют вдвое большее количества энтомопатогенного материала. Таким образом, разработка методов простого и эффективного инфицирования непарного шелкопряда бактериями *Wolbachia* является на сегодняшний день актуальным вопросом.

Благодарности

Работа была поддержана Программой ФНИ государственных академий наук на 2013–2020 гг. Проект № VI.51.1.5, базовым бюджетным проектом № VI.53.1.2 и грантом РФФИ № 12-04-01319а.

Литература

- Ильинский А.И., Тропин И.В. 1965. Надзор, учёт и прогноз массовых размножений хвое- и листогрызущих насекомых в лесах СССР. М.: Лесная Промышленность. 525 с.
- Bourtzis K. 2008. *Wolbachia*-based technologies for insect pest population control // *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Vol.627. P.104–113.
- Boyle L., O'Neill S. L., Robertson H. M., Karr T.L. 1993. Interspecific and intraspecific horizontal transfer of *Wolbachia* in *Drosophila* // *Science*. Vol.260. P.1796–1799.
- Graham R.I., Grzywacz D., Mushobozi W.L., Wilson K. 2012. *Wolbachia* in a major African crop pest increases susceptibility to viral disease rather than protects // *Ecology Letters*. Vol.15. P.993–1000.
- Higashiura Y., Yamaguchi H., Ishihara M., Ono N., Tsukagoshi H., Yokobori S., Tokishita S., Yamagata H., Fukatsu T. 2011. Male death resulting from hybridization between subspecies of the gypsy moth, *Lymantria dispar* // *Heredity*. Vol.106. P.603–613.
- Hilgenboecker K., Hammerstein P., Schlattmann P., Telschow A., Werren J.H. 2008. How many species are infected with *Wolbachia*? — a statistical analysis of current data // *FEMS Microbiology Letters*. Vol.281. P.215–220.
- Hurst G.D.D., Jiggins F.M. 2005. Problems with mitochondrial DNA as a marker in population, phylogeographic and phylogenetic studies: the effects of inherited symbionts // *Proceedings of Biological Science*. Vol.272. P.1525–1534.
- Liebholt A., Mastro V., Schaefer P.W. 1989. Learning from the legacy of Leopold Trouvelot // *Bulletin of the Entomological Society of America*. Vol.35. P.20–22.
- Marmur J. 1961. A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms // *Journal of Molecular Biology*. Vol.3. P.208–218.
- Poinot D., Bourtzis K., Markakis G., Savakis C., Mercot H. 1998. *Wolbachia* transfer from *Drosophila melanogaster* into *D. simulans*: Host effect and cytoplasmic incompatibility relationships // *Genetics*. Vol.150. P.227–237.
- Qian T.R. 2000. Gypsy moths' damage to America and measures taken by United States Department of Agriculture // *Plants Quarantine*. Vol.14. P.317–318.
- van Frankenhuyzen K., Reardon R.C., Dubois N.R. 2007. Forest defoliators // Lacey L.A., Kaya H.K. (eds): *Field Manual of Techniques in Invertebrate Pathology*. Netherlands, Springer, P.481–504.
- Werren J.H. 1997. Biology of *Wolbachia* // *Annual Review of Entomology*. Vol.42. P.587–609.
- Xi Z., Khoo C. C. H., Dobson S. L. 2005. *Wolbachia* establishment and invasion in an *Aedes aegypti* laboratory population // *Science*. Vol.310. P.326–328.
- Zabalou S., Riegler M., Theodorakopoulou M., Stauffer C., Savakis C., Bourtzis K. 2004. *Wolbachia*-induced cytoplasmic incompatibility as a means for insect pest population control // *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. Vol.101. P.15042–15045.
- Zug R., Hammerstein P. 2012. Still a host of hosts for *Wolbachia*: analysis of recent data suggests that 40 % of terrestrial arthropod species are infected // *PLoS ONE*. Vol.7. P.1–3.