

БАКТЕРИАЛЬНАЯ МИКРОБИОТА ДРЕВЕСНОЙ НЕМАТОДЫ *BURSAPHELENCHUS MUCRONATUS*

О. А. Кулинич¹, Е. Н. Арбузова¹, Е. С. Мазурин¹, А. Ю. Рысс², У. Ш. Магомедов¹, Н. И. Козырева³

¹Всероссийский центр карантина растений, ул. Пограничная, 32, Московская обл., 140150, Россия, okulinich@mail.ru

²Зоологический институт РАН, СПб, Россия

³Центр паразитологии ИПЭЭ РАН, Москва

Вилт хвойных пород, возбудителем которого является сосновая стволовая нематода *Bursaphelenchus xylophilus*, относится к числу наиболее экономически значимых заболеваний хвойных пород в мире. Большинство стран мира, включая Россию, внесли вид *B. xylophilus* в перечень карантинных организмов. Исследования в РФ по выявлению сосновой стволовой нематоды, начатые в 1990-х годах, показали отсутствие *B. xylophilus* и широкое распространение древесной хвойной нематоды *B. mucronatus* – вида, близкородственного *B. xylophilus*. Вид *B. mucronatus* считается непатогенным, однако наблюдения показали, что некоторые изоляты этого вида могут быть патогенными и вызывать в ряде случаев гибель деревьев. Какие факторы влияют на патогенность вида *B. xylophilus*, и может ли вид *B. mucronatus* вызывать увядание хвойных деревьев, подобно *B. xylophilus*? Последние исследования китайских и корейских ученых показывают, что «вилт хвойных пород», вызываемый нематодой *B. xylophilus*, на самом деле вызывается комплексом патогенов, где главенствующую роль играют именно патогенные бактерии, находящиеся на кутикуле нематод этого вида (Zhao, 2008). Целью наших исследований стало изучение микробиоты различных географических изолятов нематод *B. mucronatus*, распространенных на территории РФ. Ниже дан анализ предварительных данных по бактериальной микробиоте нематод *B. mucronatus*.

Материал и методы

Девятнадцать изолятов нематод *B. mucronatus* были выделены в 2010 г. из древесины хвойных пород (сосны обыкновенной *Pinus sylvestris*, сосны сибирской *P. sibirica*, сосны корейской *P. korajensis*, пихты обыкновенной *Abies alba*, пихты белокорной *Abies nephrolepis*, ели корейской, *Picea korajensis*, лиственницы Каяндера (*Larix cajanderi*), собранных в Красноярском, Забайкальском, Приморском, Хабаровском, Алтайском краях и Республике Алтай. Идентификацию нематод проводили морфологическим методом с использованием молекулярных методов диагностики – «ПЦР-Flash» (Кулинич и др., 2008). Нематод *B. mucronatus* и выделенные с них бактерии культивировали на грибе *Botrytis cinerea* на картофельном сусле-агаре.

Идентификацию бактерий проводили с использованием прямого секвенирования гена 16S rRNA. Применяли амплификацию с праймерами 8UA forward 5'-aga gtt tga tcm tgg etc ag-3' и 519B reverse 5' -gta tta csg cgg ckg ctg-3'. Далее с ними же проводили секвенирование (ЗАО Синтол, Москва). Реакционная смесь одной ПЦР-реакции объемом 25 мкл содержала: 1х ПЦР буфер (Диалат, Москва), 2мМ MgCl₂, 200мкМ каждого из dNTP, 20пкМ каждого из праймеров, 2 ед. «hot-start» SmarTag полимеразы (Диалат, Москва). Температурно-временные параметры амплификации включали: преднагревание 95 °С – 5 мин, далее 35 циклов, состоящих из 95 °С – 15 сек, 55 °С – 30 сек, 72 °С – 30 сек; финальный досинтез 72 °С – 10 мин; хранение при +4 °С. Полученный продукт ПЦР очищали с использованием набора Fermentas (#K0701) «GeneJET PCR». Последовательности после секвенирования выравнивали при помощи программы BioEdit. Выровненные последовательности оценивали в приложении BLAST NCBI.

Результаты и обсуждение

В результате исследований 19-ти различных географических изолятов нематод *B. mucronatus* выделено десять видов бактерий, относящихся к 6 родам (табл. 2). Фактически все обнаруженные виды считаются сапрофитными, за исключением *Pseudomonas fluorescens*. Бактерии данного вида выделены нами с изолятов нематод из Алтайского края (растение-хозяин *Pinus sylvestris*) и Забайкальского края (растения-хозяева – хвойные породы). Именно этот вид бактерий выделялся китайскими исследователями с изолятов нематод *B. xylophilus* и именно с ним они связывают патогенность нематодно-бактериального комплекса на соснах. Информация в отношении *P. fluorescens* противоречива. С одной стороны бактерии этого вида используются в практике в качестве биоагента, предохраняющего корни растений от заражения патогенными видами грибов и бактерий, а с

другой стороны, опыты китайских ученых доказывают значимость бактерий *P. fluorescens*, как основного возбудителя вилта хвойных пород в Китае (Zhao et al., 2008).

Таблица 1. Перечень изолятов нематод *B. mucronatus*, исследованных на бактериальную микробиоту

Регион РФ	Изоляты нематод (код)	Растение-хозяин	Примечание
Алтайский край	A7	Сосна (<i>Pinus</i> sp.)	Лесонасаждение
	A1	Сосна сибирская	Склад с лесоматериалами
	A11	Сосна (<i>Pinus</i> sp.)	Лесонасаждение
Красноярский край	2-5-1-1	Сосна (<i>Pinus</i> sp.)	Лесонасаждение
Забайкальский край	32А	Хвойные	Лесонасаждение
	56А	Хвойные	Погрузочные площадки
	49Б	Хвойные	Погрузочные площадки
	65Б	Хвойные	Погрузочные площадки
	73А	Хвойные	Погрузочные площадки
	78Б	Хвойные	Погрузочные площадки
	70Б	Хвойные	Погрузочные площадки
Приморский край	80А	Пихта белокорая <i>Abies nephrolepis</i>	Погрузочные площадки
	74А	Пихта белокорая <i>Abies nephrolepis</i>	Погрузочные площадки
Хабаровский край	169Б	Пихта <i>Abies</i>	Лесонасаждение
	203А	Лиственница (<i>Larix</i> sp.)	Склад лесоматериалов
	63Б	Ель <i>Picea</i>	Склад лесоматериалов
	53А	Лиственница (<i>Larix</i> sp.)	Склад заготовки древесины
	13А	Лиственница (<i>Larix</i> sp.)	Склад заготовки древесины
Иркутск	Bmlr	Сосна (<i>Pinus</i> sp.)	-

Таблица 2. Видовой состав бактерий, выделенных с различных изолятов нематод *Bursaphelenchus mucronatus*

Видовой состав бактерий, выделенных с изолятов нематод <i>B. mucronatus</i>	По нашим данным	По данным Zhao et al., 2009
<i>Acinetobacter lwoffii/junii</i>		+
<i>A. hydrophila</i>		+
<i>Achromobacter</i> sp.	+	
<i>Actinobacillus ureae</i>		+
<i>Aeromonas hydrophila</i>		+
<i>Bacillus subtilis</i>	+	
<i>Burkholderia xenovorans</i>	+	
<i>Enterobacter intermedius</i>		+
<i>Enterobacter cloacae</i>		+
<i>Enterococcus casseliflavus</i>		+
<i>Escherichia hermannii</i>		+
<i>Flavobacterium</i> sp.	+	
<i>Pantoea agglomerans</i>		+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		+
<i>Pseudomonas cloacae</i>		+
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	+	
<i>Pseudomonas intermedium</i>		+
<i>Pseudomonas lurida</i>	+	
<i>Pseudomonas putida</i>		+
<i>Pseudomonas</i> sp.	+	
<i>Rahnella aquatilis</i>	+	
<i>Rahnella</i> sp.	+	
<i>Serratia marcescens</i>		+
<i>Staphylococcus aeruginosa</i>		+
<i>Staphylococcus auricularis</i>		+
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	+	

Разные изоляты нематод *B. mucronatus* содержали различные виды бактерий. Наиболее часто выделялись бактерии рода *Pseudomonas*. В ранних исследованиях (Zhao et al., 2009) при изучении микробиоты *B. mucronatus* выявлено шестнадцать видов бактерий. При этом видовой состав этой бактериальной микробиоты отличается от таковой, выделенной в настоящее время. Наиболее часто

в обоих исследованиях встречаются бактерии, относящиеся к роду *Pseudomonas*. Следует отметить, что бактерии *P. fluorescens* ранее на нематодах *B. mucronatus* не выявлялись, только на *B. xylophilus* (Zhao et al., 2009). Мы не исключаем, что некоторые изоляты *B. mucronatus* могут нести патогенные бактерии, и в таком случае нематодо-бактериальный комплекс (*B. mucronatus* + бактерии) также может быть высоко патогенным, как и с видом *B. xylophilus*, однако для проявления вилта необходимо наличие благоприятных климатических факторов, а также подходящего растения-хозяина.

Литература

- Кулинич О. А., Рогожин Е. А., Рысс А. Ю., Дренова Н. В., Пономарев В.Л. Сосновая стволовая нематода: освоен экспресс-метод ее выявления // Защита и карантин растений, 2008, 11, с. 32–33.
- Zhao B. G. Bacteria carried by the pine wood nematode and their symbiotic relationship with nematode. In: Zhao B.G., Futai K., Sutherland J.R., Takeuchi Y. (eds.), Pine Wilt Disease, Tokyo: Springer, 2008, p. 264–274.
- Zhao B.G., Lin F., Guo D., Li R.G., Li S.N., Kulinich O., Ryss A. Pathogenic roles the bacteria carried by *Bursaphelenchus mucronatus*. Journal of Nematology, 2009, 41(1), p. 11-16.

ИСТОЧНИКИ И ПУТИ ФОРМИРОВАНИЯ ФАУНЫ МОРСКИХ ПАЗАРИТИЧЕСКИХ НЕМАТОД

М. В. Мардашова¹, В. В. Алешин², М. А. Никитин²

¹Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

²НИИ физико-химической биологии, им. А.Н. Белозерского, Москва, Россия, biccinum@mail.ru

Паразитические нематоды в море почти так же многочисленны, как на суше и в пресных водах, но таксономический состав их фаун принципиально отличается. Паразиты наземных организмов разнообразны, объединяются в системе со свободноживущими видами и переходили к паразитизму многократно. Огромное же большинство морских паразитических нематод относится к спируридо-аскариидному комплексу отрядов, связанному с позвоночными хозяевами. Видов морских паразитических нематод, которые не принадлежали бы к этому комплексу, немного. Среди них есть виды, родственные наземным паразитам, но у многих систематическое положение неясно. В последнем случае также можно предполагать их автохтонное, морское происхождение. Сведений об анатомии и эмбриологическом развитии морских паразитических нематод недостаточно, чтобы определить их место в системе и происхождение, без привлечения молекулярных данных [1,5].

В нашем распоряжении оказались два вида морских паразитических нематод: *Nematimermis enoplivora* [4] – паразит других нематод с литорали Белого моря и *Trophomera sp.*, из семейства Benthimermithidae [3], виды которого являются специализированными паразитами морских беспозвоночных.

Цель настоящей работы – определение места этих двух паразитов среди других нематод, чтобы приблизиться к решению проблемы происхождения фауны морских паразитических нематод. Для достижения выбранной цели мы поставили перед собой задачу определить ближайших родственников изучаемых видов, а также предположить возможные пути формирования данных паразитических групп.

Из фиксированных спиртом нематод мы выделили ДНК [2,6], амплифицировали гены рибосомной РНК с помощью полимеразной цепной реакции. Чтение последовательностей генов осуществляли секвенированием как очищенных спиртовым осаждением и препаративным электрофорезом фрагментов, так и рекомбинантных плазмид после клонирования. Для сравнения последовательностей с таковыми других нематод мы заранее подготовили множественное выравнивание из 93 известных последовательностей различных нематод.

Филогенетический анализ полученных данных установил принадлежность *N. enoplivora* к отряду Mermithida, что указывает на переход к морским хозяевам их предка уже сформировавшегося как паразит наземных беспозвоночных. Таким образом, впервые получены убедительные доказательства перехода к жизни в морских хозяевах паразитических нематод, наземных по происхождению, за пределами от спируридо-аскариидных нематод.

Совсем иное положение у *Trophomera sp.* Семейство Benthimermithidae обособлено от любых других семейств нематод и связано отдаленным родством с морскими и пресноводными видами от-