

## СКРИНИНГ ПАУТИННЫХ КЛЕЩЕЙ РОДА *TETRANYCHUS* (ACARI: *TETRANYCHIDAE*) НА НАЛИЧИЕ БАКТЕРИАЛЬНЫХ СИМБИОНТОВ

Н.Д. КОНОПЛЕВ<sup>1</sup>, А.Н. ИГНАТОВ<sup>2,3</sup>, С.Я. ПОПОВ<sup>1</sup>

( <sup>1</sup>РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева; <sup>2</sup>ООО Исследовательский центр «ФитоИнженерия»; <sup>3</sup>Российский университет дружбы народов)

Эндосимбиотические бактерии членистоногих-фитофагов, особенно массовых видов, вызывают большой интерес в связи с их воздействием на репродукцию, пищевую избирательность, поведение и устойчивость к стрессовым факторам. В статье приведены результаты скрининга обыкновенного паутинного клеща *Tetranychus urticae* Koch, 1836 и атлантического паутинного клеща *Tetranychus atlanticus* McGregor, 1941 (*sensu* Mitrofanov et al., 1987). Колонии упомянутых видов первично были собраны на территории четырех стран: России, Украины, Германии и Японии. Скрининг проводился как по ДНК, выделенной из бактерий, так и по ДНК, выделенной целиком из хозяина. Были обнаружены бактерии родов *Cardinium*, *Erwinia*, *Ralstonia*, *Staphylococcus*, *Serratia*, *Yersinia*, *Haemophilus* и *Pseudomonas*. Бактерии *Cardinium* — широко известные внутриклеточные симбионты, способные вызывать у членистоногих репродуктивные нарушения. Представители рода *Staphylococcus* ранее были отмечены у ряда видов клещей, еще раньше они обнаруживались в составе флоры кожи человека. Остальные виды бактерий были впервые обнаружены в паутинных клещах.

**Ключевые слова:** паутинные клещи, *Tetranychus*, симбионты, *Cardinium*, *Erwinia*, *Ralstonia*, *Staphylococcus*, *Serratia*, *Yersinia*, *Haemophilus*.

Бактериальные симбионты эукариот крайне разнообразны: имея сопряженную эволюцию с хозяевами-эукариотами [19], они тем не менее демонстрируют различный образ жизни [25]. В частности, симбиотические бактерии различаются по степени зависимости от жизненного цикла хозяина, могут населять различные ткани хозяев включая меж- и внутриклеточное пространство. Кроме того, они могут приносить хозяевам пользу, обеспечивая питательными веществами, осуществляя биолюминесценцию [18], отвечая за выработку ферментов, токсинов и антибиотиков [4].

Несмотря на то, что многие бактериальные симбионты приносят хозяевам пользу, они также могут использовать хозяев в собственных жизненных стратегиях [19]. К примеру, вертикально переносимые паразиты (такие, как *Wolbachia* и *Cardinium* [27]) управляют репродукцией хозяев таким образом, чтобы максимизировать собственный перенос путем смещения полового соотношения хозяина в сторону самок (при этом они не передаются самцам), либо вызывая цитоплазматическую несовместимость [22].

Бактериальные симбионты насекомых-фитофагов и клещей-фитофагов могут обуславливать пищевую специализацию и устойчивость хозяев к ряду стрессовых

факторов. На примере щитников *Megacopta cribraria* было доказано, что в некоторых случаях специализация насекомого-вредителя зависит от генотипа его симбионта, а не от генотипа насекомого [11]. Заражение насекомого бактериальным симбионтом, разлагающим инсектициды, может вызывать его устойчивость к химикатам [14]. Среди бактериальных симбионтов насекомых и клещей нередко встречаются также виды, родственные фитопатогенным бактериям, патогенам самих членистоногих, и патогенам млекопитающих и человека [8].

Разнообразие симбиотических бактерий насекомых в несколько раз больше такового у клещей. При этом у обеих групп имеются представители одних и тех же видов бактерий, что указывает на возможность обнаружения известных, но еще не описанных у клещей симбионтов.

В статье приведены результаты скрининга различных популяций наиболее широко распространенных и экономически значимых видов паутиных клещей рода *Tetranychus* на наличие заражения как известными бактериальными симбионтами, так и не характерными для симбиоза видами.

## Методика исследований

### Паутиные клещи

В качестве объектов исследований служили массовые виды паутиных клещей: обыкновенный паутиный клещ *Tetranychus urticae* Koch, 1836, и атлантический паутиный клещ *Tetranychus atlanticus* McGregor, 1941 (sensu Mitrofanov et al., 1987). Последний вид рассматривается нами как близкий к туркестанскому паутиному клещу *Tetranychus turkestanii* Ugarov et Nikolski, 1937, вслед за Митрофановым и др., 1987 [1], однако ряд зарубежных исследователей нередко сводит его в синоним *T. turkestanii*.

Популяции паутиных клещей обозначенных видов, использованные в данном исследовании, были собраны на территории четырех стран (Россия, Украина, Германия и Япония) и культивировались на кафедре защиты растений РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева (табл. 1). Маточные колонии содержали на срезанных листьях фасоли обыкновенной, помещенных на ватные колобки в кюветках с водой при температуре 20–22°C, относительной влажности 70 ± 10%, фотопериоде (L:D) 16:8 ч.

### Выделение ДНК и условия ПЦР

ДНК выделяли путем гомогенизации одиночных взрослых особей клещей в 15 мкл (самцы) или в 25 мкл (самки) смеси STE буфера (100 ммоль NaCl, 10 ммоль Tris-HCl, 1 ммоль EDTA, pH 8.0) и протеиназы К (10 мг/мл, 2 мкл) в 1,5 мл пробирке Eppendorf. Смесь инкубировали 30 мин. при 37°C, а затем — 5 минут при 95°C [31]. Амплификацию проводили с применением комплекта реактивов «Encyclo Plus PCR kit» (Евроген, Россия) в соответствии с инструкцией производителя. Список праймеров, использованных в данном исследовании, а также расчетные температуры отжига, представлены в таблице 2. Общий протокол амплификации: предварительная денатурация — 2 мин. при 94°C, затем 35 циклов по 30 с при 94°C, 30 с отжига, 30 с при 72°C, и финальная элонгация — 5 мин. при 72°C. Протокол амплификации оптимизировали при необходимости. Продукты ПЦР визуализировали после электрофореза в 1,5%-ном агарозном геле в 0,5-кратном трис-боратном буфере в течение 2-х ч при напряжении 4 В/см.

**Список популяций паутинового клеща *T. urticae* и *T. atlanticus*,  
использованных в работе**

№	Вид по морфологическим признакам	Место сбора	Растение-хозяин
1	<i>T. urticae</i>	г. Мюнхен (Германия)	Вьюнок полевой ( <i>Convolvulus arvensis</i> )
2	<i>T. atlanticus</i>	г. Москва (Россия), территория РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева	Борщевик Сосновского ( <i>Heracleum sosnowskyi</i> )
3	<i>T. urticae</i>	г. Новоаннинский Волгоградской области (Россия). У реки Бузулук, лесная опушка	Кирказон ( <i>Aristolochia</i> sp.)
4	<i>T. urticae</i>	г. Такикава, Хоккайдо (Япония)	Арбуз обыкновенный ( <i>Citrullus lanatus</i> )
5	<i>T. atlanticus</i>	г. Новоаннинский Волгоградской области (Россия). Степь	Хатьма ( <i>Lavatera</i> spp.)
6	<i>Tetranychus</i> spp.	с. Мигия Николаевской области (Украина). Побужье, ландшафтный парк	Коровяк скипетровидный ( <i>Verbascum densiflorum</i> )
7	<i>Tetranychus</i> spp.	Херсонская область (Украина). Черноморский биосферный заповедник	Ипомея ( <i>Ipomoea</i> spp.)

**Список специфичных и случайных ДНК праймеров, использованных в работе**

Название	Последовательность	Целевая последовательность или вид	Температура отжига, °С	Источник
REP1A	CGTGCCAACGACAAGGACC	-	60	-
27F	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	Ген 16S <i>pPHK</i> бактерий	55	[13]
1492R	CGGTTACCTTGTTACGACTT			
CLOf	GCGGTGTAAATGAGCGTG	Ген 16S <i>pPHK</i> <i>Cardinium</i> spp.	57	[28]
CLOr1	ACCTMTTCTTAACCAAGCCT			
Past575-F	GCCCCTTGGGAATGTACTGAC	Ген 16S <i>pPHK</i> <i>Pasteurella</i> spp.	64	[29]
Past575-R	GGACTTAGATGCACTTTCTGAGATTC			
Cell337-F	TGTAAGCACTTTCAGTGGGGAG	Ген 16S <i>pPHK</i> <i>Cellvibrio</i> spp.	64	[29]
Cell337-R	TCAGTATGAGTCCAGGGTGTC			
Erw327-F	GGCCTTGACATCCACGGAAT	Ген 16S <i>pPHK</i> <i>Erwinia</i> spp.	64	[29]
Erw327-R	TACGACGCACTTTATGAGGTC			

При подготовке к секвенированию продукты ПЦР были очищены при помощи набора «Cleanup Standard» (Евроген, Россия). Секвенирование проводили по методу Сенгера [21] на автоматическом секвенаторе «DNA Analyzer 3730» (Applied Biosystems, США) с использованием набора реактивов «BigDye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kit» (Applied Biosystems, США) согласно инструкции по применению. Каждая последовательность была секвенирована с использованием прямых и обратных праймеров. Первичный анализ полученных последовательностей проводили с помощью программы BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Выравнивание гомологичных последовательностей осуществляли с помощью программы CLUSTALW v.1.75 [24]. Окончательную проверку и редактирование последовательностей проводили с помощью пакета программ BioEdit v.7 [10]. Построение филогенетических деревьев проводили с использованием алгоритмов ME (minimum evolution) [20] и MP (maximum parsimony), реализованных в программе MEGA 6.0 [23]. Статистическую достоверность полученных деревьев рассчитывали с помощью бутстреп- («bootstrap»)-анализа путем построения 500 альтернативных деревьев [7].

## Результаты исследований

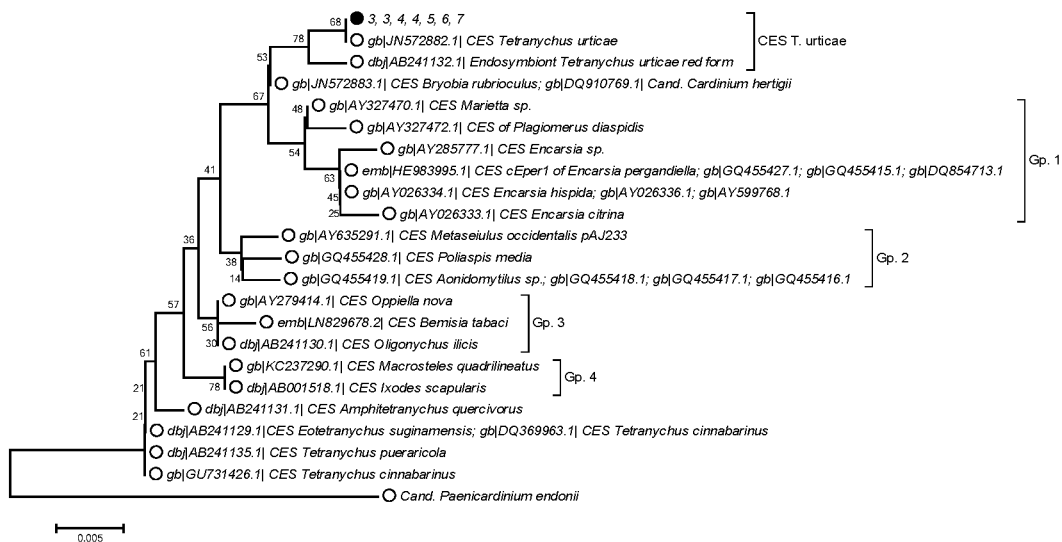
### Эндосимбионты вида *Cardinium hertigii*

В ходе амплификации ДНК паутиных клещей популяций № 3–7 (табл. 1) с праймерами CLOf/CLOr1 были получены целевые фрагменты гена 16S рРНК длиной примерно 400 п.о., типичные для эндосимбионтов вида *Cardinium hertigii*, имеющие сходство не менее 98% с последовательностью образцов Генбанка DQ910769.1 и AY599768.1 (*C. hertigii*). Кластерный анализ 7 оригинальных и 32 гомологичных последовательностей, обнаруженных в Генбанке, показал, что все последовательности, амплифицированные с ДНК паутиных клещей, группировались с бутстрепом не ниже 84% с образцами Генбанка NJ572882.1 и AB241132.1, также полученными при анализе эндосимбионтов *T. urticae* (рис.).

Близко к кластеру эндосимбионтов паутинового клеща *T. urticae* (CES) с бутстрепом 53% примыкают идентичные образцы JN572883.1 и DQ910769.1, принадлежащие симбионтам клещей вида *Bryobia rubrioculus*, родственных роду *Tetranychus* (оба рода принадлежат надсемейству Tetranychosidea).

Четыре других группы (Gr. 1–4) (рис. 1), в каждую из которых вошли от 2 до 11 образцов, включали в себя эндосимбионты паразитических ос (кластер 1, состоящий из 11 образцов, наиболее близкий к симбионтам *Tetranychus urticae*), хищных клещей и ос (кластер 2, 6 образцов), симбионтов водного клеща и белокрылки (кластер 3, 3 образца), симбионтов цикадок и иксодовых клещей (кластер 4, 2 образца). Помимо этого, вне кластеров были представлены симбионты сестринской клады паутиных клещей включая виды *Tetranychus cinnabarinus* Boisduval, *Tetranychus pueraricola* Ehara & Gotoh, 1996, и др.

Анализ средних межкластерных генетических расстояний (табл. 3) показывает, что группа эндосимбионтов *T. urticae* максимально удалена от других образцов (среднее межкластерное расстояние = 0,021), в то время как кластеры 3 и 4 (симбионты водного клеща, белокрылки, цикадок и иксодовых клещей) минимально удалены друг от друга с расстоянием не более 0,008. Вместе с тем все образцы были более удалены от последовательности вида *Paenicardinium endonii*, эндосимбион-



**Рис. 1.** Эволюционные взаимоотношения 39 фрагментов ДНК гена 16S рРНК *Cardinium hertigii*, амплифицированных в особях клеща и их родственных эндосимбионтов членистоногих (*Cardinium EndoSymbionts* — CES). Филогенетическое дерево было построено методом ближнего соседа (Neighbor-Joining method) [20]. Доля повторяющихся деревьев при бутстреп-анализе [7], % (при 500 повторениях), показана рядом с ветвями. Эволюционные расстояния определяли методом максимального композитного правдоподобия, используя программу MEGA6 [23]

та фитопатогенной нематоды *Heterodera glycines* (Nemata: Tylenchida), со средним расстоянием 0,045, что указывает на принадлежность изучаемых образцов одному виду — *Cardinium hertigii*.

### *Другие симбиотические виды T. urticae*

В ходе изучения полиморфных спектров при амплификации ДНК из паутиных клещей с праймером REP1A у образца № 2 был обнаружен полиморфный фрагмент размером 809 п.о., гомологичный (72% идентичности) последовательности FN434113.1 гена гликозилтрансферазы (glucosyltransferase-I) фитопатогенной бактерии *Erwinia amylovora* CFBP1430.

Амплификация ДНК данного образца паутинового клеща с универсальными праймерами на ген *16S pPHK* дала фрагмент, последовательность которого была гомологична образцу AB680317.1 *Erwinia amylovora* штамма NBRC 12687 (95% сходства).

При выделении микроорганизмов из поверхностно-стерилизованных самок паутинового клеща популяций № 1 и № 2 на неселективных питательных средах NBY, Кинга Б и декстрозно-дрожжевом агаре с карбонатом кальция были получены бактерии нескольких морфотипов.

Наиболее распространенный морфотип был представлен на среде Кинга Б желтыми плоскими неслизистыми колониями и встречался в 90% изученных особей клещей обеих популяций. Второй по частоте морфотип был представлен белыми неслизистыми колониями и обнаружен примерно у 15% особей клещей. Ряд особей имел бактерии 1 и 2-го морфотипов одновременно.

**Эволюционные попарные расстояния** (метод максимального композитного правдоподобия — Maximum Composite Likelihood model) **между кластерами последовательностей эндосимбионтов вида *Cardinium hertigii*** (рис.), **измеренные по последовательностям фрагментов ДНК гена *16S рPHK***, **амплифицированных с праймерами CLOf/CLOr1. Стандартная ошибка оценивалась методом бутстрепа при 500 повторениях. Анализ был проведен при помощи программы MEGA6 [23]**

От кластера 1	До кластера 2	Генетическое расстояние	Стандартная ошибка
<i>T. urticae</i>	Gr 1	0,019	0,006
<i>T. urticae</i>	Gr 2	0,021	0,005
<i>T. urticae</i>	Gr 3	0,023	0,006
<i>T. urticae</i>	Gr 4	0,021	0,006
Gr 1	Gr 2	0,014	0,005
Gr 1	Gr 3	0,016	0,005
Gr 1	Gr 4	0,017	0,006
Gr 2	Gr 3	0,008	0,004
Gr 2	Gr 4	0,012	0,005
Gr 3	Gr 4	0,008	0,003

Проведенная амплификация ДНК бактерий с универсальными праймерами на ген *16S рPHK* дала для морфотипа 1 фрагменты, последовательность ДНК которых была гомологична образцу NR\_043152.1 *Ralstonia pickettii* штамма ATCC 27511 (100% сходства).

Амплифицированные и секвенированные продукты морфотипа 2 были гомологичны образцу NR\_036904.1 вида *Staphylococcus epidermidis* Füssel (100% сходства). Результаты дальнейших амплификаций ДНК из паутиных клещей с родоспецифичными праймерами на ген *16S рPHK* представлены в таблице 4. Были обнаружены фрагменты ДНК, гомологичные обнаруженным в ГенБанке последовательностям штаммов *Serratia proteamaculans* SN\_20, *Yersinia aldovae* ИНВ В 6491, *Haemophilus paraphrohaemolyticus* NCTC 10670 и *Pseudomonas fragi* 13–15.

Итак, все исследуемые популяции клещей рода *Tetranychus* были заражены бактериями рода *Cardinium*. Как уже указывалось, бактерии *Cardinium* — вертикально (от родителей к потомству) переносимый внутриклеточный симбионт, способный вызывать у хозяев цитоплазматическую несовместимость, партеногенез и феминизацию самцов [9]. Интересно, что вновь полученные последовательности были очень близки к ранее изученным для эндосимбионтов паутинового клеща различного географического происхождения. В то же время не наблюдалось соответствия между близостью последовательностей ДНК эндосимбионтов и таксономическим положением их хозяев. Это может означать, что географическая приуроченность групп эн-

**BLAST-сравнение амплифицированных фрагментов гена 16S rPHK образцов паутинного клеща с ближайшими гомологичными последовательностями Генбанка**

Популяция, №	Праймеры	Ближайший вид по данным BLAST	Схожесть	Покрывание последовательности	Образец NCBI
4	CLOf/r1	<i>Candidatus Cardinium hertigii</i>	99%	95%	DQ910769.1
4			99%	96%	
3			99%	95%	
3			99%	96%	
5			99%	93%	
7			99%	70%	
6			99%	76%	
2	27F/1492R	<i>Erwinia amylovora</i> NBRC 12687	95%	100%	AB680317.1
1/2	27F/1492R	<i>Ralstonia pickettii</i> ATCC 27511	100%	100%	NR_043152.1
1/2	27F/1492R	<i>Staphylococcus epidermidis</i> Füssel	100%	100%	NR_036904.1
4	Erw327f/r	<i>Serratia proteamaculans</i> SN_20	98%	97%	KR088620.1
3	Erw327f/r	<i>Yersinia aldovae</i> IHB B 6491	99%	96%	KR233790.1
4	Past575f/r	<i>Haemophilus paraphrohaemolyticus</i> NCTC 10670	98%	89%	NR_118142.1
4	Cell337f/r	<i>Pseudomonas fragi</i> 13-15	99%	73%	KJ817448.1
3			97%	78%	

досимбионтов внутри рода *Cardinium* все-таки существует, но представители вида *T. urticae* активно перемещаются между регионами, что приводит к гомогенизации их популяций и, соответственно, популяций их эндосимбионтов. Интересно, что наибольшую близость с эндосимбионтами клещей показали паразитические насекомые и хищные клещи, что может означать передачу эндосимбионтов рода *Cardinium* в пищевой цепочке «Фитофаг–хищник/паразит».

Остальные праймеры не показали ожидаемой родовой специфичности, амплифицировав последовательности ДНК бактерий близкородственных родов. Среди других обнаруженных эндосимбионтов паутинного клеща бактерия *Staphylococcus epidermidis* является компонентом микрофлоры покровных тканей кожи человека и животных. У людей с ослабленным иммунитетом она может вызывать инфекции. Имеются сведения о ее обнаружении в особях *T. urticae* [30], а также других видов рода *Staphylococcus* в синантропных клещах (Acari: Astigmata) [12]. Во втором случае предполагается, что эти бактерии могли попасть в пищеварительный тракт клеща вместе с пищей.

Представители рода *Erwinia* встречаются у насекомых в качестве переносимых ими фитопатогенов [17]. В частности, зафиксирован перенос пектолитических бактерий родов *Dickeya* и *Pectobacterium* тлями, что указывает на потенциальную возможность участия и паутиных клещей в роли переносчиков этих фитопатогенов.

Среди других обнаруженных бактерий *Serratia proteamaculans* известна как возбудитель пневмонии у людей с ослабленным иммунитетом [3] и патоген картофеля [16, 26]. Бактерия *Yersinia aldovae* (синоним — *Y. Enterocolitica*, группа X2) — свободноживущий вид обитающий преимущественно в водоемах, но также являющийся факультативным патогеном животных [2]; *Haemophilus paraphrohaemolyticus* — компонент микрофлоры желудка животных, также была отмечена как причина абсцесса печени [5] и выделена из носоглотки больных астмой [15]. А *Pseudomonas fragi* является типичным обитателем внутренних органов животных и наряду с другими бактериями приводит к порче молока, мяса и рыбы [6].

### Заключение

В результате скрининга паутиных клещей рода *Tetranychus* на наличие бактериальных симбионтов мы обнаружили как известные виды, так и бактерии, ранее не упоминавшиеся в связи с паутиными клещами. Часть из них относят к фитопатогенным видам, а часть — к спутникам или факультативным патогенам животных. Известна роль эндосимбионтов фитофагов в подавлении популяции энтомофагов и паразитов. Данный факт является поводом для более детального изучения паутиных клещей не только в качестве вредителя сельскохозяйственных культур, но и в их связи с патогенными микроорганизмами.

*Авторы выражают признательность доктору Т. Готох (Dr. T. Gotoh) за предоставленную для исследований колонию T. urticae (г. Такакава, Хоккайдо, Япония), а также доктору И.А. Акимову за возможность взять пробы паутиных клещей рода Tetranychus на Украине.*

### Библиографический список

1. Понов С.Я. Таксономический статус ряда видов паутиных клещей рода *Tetranychus* (Acari: Tetranychidae) и репродуктивные барьеры при скрещивании морфологически близких и отдаленных видов // Экологические аспекты ограничения вредоносности популяций насекомых и клещей: Сборник статей. М.: Издательство РГАУ–МСХА, 2013. С. 224–259.
2. Bercovier H., Steigerwalt A.G., Guiyoule A., Huntley–Carter G., Brenner D.J. *Yersinia aldovae* (Formerly *Yersinia enterocolitica*–Like Group X2): a New Species of Enterobacteriaceae Isolated from Aquatic Ecosystems // International Journal of Systematic Bacteriology. 1984. V. 34. № 2. P. 166–172.
3. Bollet C., Grimont P., Gannier M., Geissler A., Sainty J.M., De Micco P. Fatal pneumonia due to *Serratia proteamaculans* subsp. *quinovora* // Journal of clinical microbiology. 1993. V. 31. № 2. P. 444–445.
4. Currie C.R., Scott J.A., Summerbell R.C., Malloch D. Fungus–growing ants use antibiotic–producing bacteria to control garden parasites // Nature. 1999. V. 398. № 6729. P. 701–704.
5. Douglas G.W., Buck L.L., Rosen C. Liver abscess caused by *Haemophilus paraphrohaemolyticus* // Journal of clinical microbiology. 1979. V. 9. № 2. P. 299–300.
6. Ercolini D., Russo F., Blaiotta G., Pepe O., Mauriello G., Villani F. Simultaneous detection of *Pseudomonas fragi*, *P. lundensis*, and *P. putida* from meat by use of a multiplex PCR assay targeting the *carA* gene // Applied and environmental microbiology. 2007. V. 73. № 7. P. 2354–2359.



7. Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap // *Evolution*. 1985. V. 39. № 4. P. 783–791.
8. Geest L.P.S. van der, Bruin J. Diseases of mites and ticks: from basic pathology to microbial control — an introduction // *Experimental & applied acarology*. 2008. V. 46. № 1–4. P. 3–6.
9. Gotoh T., Noda H., Ito S. *Cardinium* symbionts cause cytoplasmic incompatibility in spider mites // *Heredity*. 2007. V. 98. № 1. P. 13–20.
10. Hall T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT // *Nucleic Acids Symp.* 1999. Ser. V. 41. P. 95–98.
11. Hosokawa T., Kikuchi Y., Shimada M., Fukatsu T. Obligate symbiont involved in pest status of host insect // *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society*. 2007. V. 274. № 1621. P. 1979–1984.
12. Hubert J., Kopecký J., Perotti M.A., Nesvorná M., Braig H.R., Ságová-Marečková M., Macovei L., Zurek L. Detection and identification of species-specific bacteria associated with synanthropic mites // *Microbial ecology*. 2012. V. 63. № 4. P. 919–928.
13. Jiang H., Dong H., Zhang G., Yu B., Chapman L.R., Fields M.W. Microbial diversity in water and sediment of Lake Chaka, an athallassohaline lake in northwestern China // *Applied and environmental microbiology*. 2006. V. 72. № 6. P. 3832–3845.
14. Kikuchi Y., Hayatsu M., Hosokawa T., Nagayama A., Tago K., Fukatsu T. Symbiont-mediated insecticide resistance // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2012. V. 109. № 22. P. 8618–8622.
15. Kilian M., Heine-Jensen J., Bülow P. *Haemophilus* in the Upper Respiratory Tract of Children // *Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica Section B Microbiology and Immunology*. 2009. V. 80B. № 4. P. 571–578.
16. Matveeva E.V., Ignatov A.N., Tsygankova S.V., Pekhtereva E.Sh., Fokina V.G., Schaad N.W. Phenotypic and genetic diversity of Russian population of blackleg and soft-rot *Erwinia* // *Gent, Belgium*. 2005. P. 160.
17. Nadarasah G., Stavrinides J. Insects as alternative hosts for phytopathogenic bacteria // *FEMS microbiology reviews*. 2011. V. 35. № 3. P. 555–575.
18. Nyholm S.V., McFall-Ngai M.J. The winnowing: establishing the squid-vibrio symbiosis // *Nature reviews. Microbiology*. 2004. V. 2. № 8. P. 632–642.
19. Sachs J.L., Essenberg C.J., Turcotte M.M. New paradigms for the evolution of beneficial infections // *Trends in ecology & evolution*. 2011. V. 26. № 4. P. 202–209.
20. Saitou N., Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees // *Molecular biology and evolution*. 1987. V. 4. № 4. P. 406–425.
21. Sanger F., Coulson A.R. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase // *Journal of molecular biology*. 1975. V. 94. № 3. P. 441–448.
22. Stouthamer R., Breeuwer J.A., Hurst G.D. *Wolbachia pipientis*: microbial manipulator of arthropod reproduction // *Annual review of microbiology*. 1999. V. 53. P. 71–102.
23. Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipiński A., Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. // *Molecular biology and evolution*. 2013. V. 30. № 12. P. 2725–2729.
24. Thompson J.D., Gibson T.J., Plewniak F., Jeanmougin F., Higgins D.G. The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools // *Nucleic acids research*. 1997. V. 25. № 24. P. 4876–4882.
25. Toft C., Andersson S.G.E. Evolutionary microbial genomics: insights into bacterial host adaptation // *Nature reviews. Genetics*. 2010. V. 11. № 7. P. 465–475.
26. Tsygankova S.V., Matveeva E.V., Pekhtereva E.Sh., Ignatov A.N., Schaad N.W. Genetic diversity among strains of pectolytic *Erwinia* in potato in Russia // *Ocean City, MD*. 2005. P. 25–26.
27. Weeks A.R., Turelli M., Harcombe W.R., Reynolds K.T., Hoffmann A.A. From parasite to mutualist: rapid evolution of *Wolbachia* in natural populations of *Drosophila* // *PLoS biology*. 2007. V. 5. № 5. P. 114.

28. Weeks A.R., Velten R., Stouthamer R. Incidence of a new sex-ratio-distorting endosymbiotic bacterium among arthropods // Proceedings. Biological sciences / The Royal Society. 2003. V. 270. № 1526. P. 1857–1865.

29. Wright E.S., Yilmaz L.S., Ram S., Gasser J.M., Harrington G.W., Noguera D.R. Exploiting extension bias in polymerase chain reaction to improve primer specificity in ensembles of nearly identical DNA templates // Environmental microbiology. 2014. V. 16. № 5. P. 1354–1365.

30. Yoon C. Bacterial Diversity and Distribution from the Whole Mite Extracts in Acaricide Resistant and Susceptible Populations of Twospotted Spider Mite—*Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) // Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry. 2010. V. 53. № 4. P. 446–457.

31. Zhao D.-X., Chen D.-S., Ge C., Gotoh T., Hong X.-Y. Multiple Infections with *Cardinium* and Two Strains of *Wolbachia* in The Spider Mite *Tetranychus phaselus* Ehara: Revealing New Forces Driving the Spread of *Wolbachia* // PLoS ONE. 2013. V. 8. № 1. P. e54964.

## SCREENING OF SPIDER MITES OF THE GENUS *TETRANYCHUS* (ACARI: *TETRANYCHIDAE*) FOR THE PRESENCE OF BACTERIAL SYMBIONTS

N.D. KONOPLEV<sup>1</sup>, A.N. IGNATOV<sup>2,3</sup>, S.YA. POPOV<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> Russian Timiryazev State Agrarian University;

<sup>2</sup> «Phytoengineering» R&D Center;

<sup>3</sup> Peoples' Friendship University of Russia)

*Endosymbiotic bacteria of arthropods, including economically important phytophagous, cause a great interest of researchers due to their effect on arthropod's reproduction, food selectivity, behavior and resistance to stress factors. Diversity of insect symbiotic bacteria several times larger than that of mites, while both groups have representatives of the same bacterial species, suggesting the possibility of detection of known but not yet associated with mites symbionts. We found the existence of some known and new bacteria in Tetranychus spider mites, in particular, Tetranychus urticae Koch 1836, and Tetranychus atlanticus McGregor 1941 (sensu Mitrofanov et al., 1987), that was presented by us to be close to Tetranychus turkestanii Ugarov et Nikolski 1937, but morphologically different after Mitrofanov et al. Samples of mentioned spider mite species were collected on the territories of 4 countries: Russia, Ukraine, Germany and Japan. The data were obtained by direct isolation of the bacteria as well as by PCR diagnostics of total material extracted from mites. Representatives of the genera Cardinium, Erwinia, Ralstonia, Staphylococcus, Serratia, Yersinia, Haemophilus and Pseudomonas were found among examined bacteria. They include well-known symbionts, and species, previously not associated with spider mites. Some of them relate to phytopathogenic bacteria, and some species — to animal and human pathogens. In particular, Serratia proteamaculans known as the causative agent of pneumonia, Haemophilus paraphrohaemolyticus was noted as a cause of liver abscess and was isolated from the nasopharynx of children with asthma.*

**Key words:** spider mites, *Tetranychus*, symbionts, *Cardinium*, *Erwinia*, *Ralstonia*, *Staphylococcus*, *Serratia*, *Yersinia*, *Haemophilus*.

## References

1. Popov S.Ia. Taksonomicheskii status riada vidov pautinnykh kleshchei roda *Tetranychus* (Acari: *Tetranychidae*) i reproductivnye bar'ery pri skreshchivanii morfologicheski blizkikh i otdalennykh vidov [The taxonomic status of several species of spider mites of the genus *Tetranychus* (Acari: *Tetranychidae*) and reproductive barriers by crossing morphologically close and distant species]. *Ekologicheskie aspekty ogranicheniia vredonosnosti populatsii nasekomykh i kleshchei: sbornik statei*. [Ecological aspects of limiting the harmfulness of insects and mites populations: a collection of articles]. 2013. Moscow. Publishing House of Russian Timiryazev State Agrarian University. P. 224–259.
2. Bercovier H., Steigerwalt A.G., Guiry A., Huntley-Carter G., Brenner D.J. *Yersinia* aldovae (Formerly *Yersinia enterocolitica*-Like Group X2): a New Species of Enterobacteriaceae Isolated from Aquatic Ecosystems. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 1984. Vol. 34. № 2. P. 166–172.
3. Bollet C., Grimont P., Gannier M., Geissler A., Sainty J.M., De Micco P. Fatal pneumonia due to *Serratia proteamaculans* subsp. *Quinovora*. *Journal of clinical microbiology*. 1993. Vol. 31. № 2. P. 444–445.
4. Currie C.R., Scott J.A., Summerbell R.C., Malloch D. Fungus-growing ants use antibiotic-producing bacteria to control garden parasites. *Nature*. 1999. Vol. 398. № 6729. P. 701–704.
5. Douglas G.W., Buck L.L., Rosen C. Liver abscess caused by *Haemophilus paraphrohaemolyticus*. *Journal of clinical microbiology*. 1979. Vol. 9. № 2. P. 299–300.
6. Ercolini D., Russo F., Blaiotta G., Pepe O., Mauriello G., Villani F. Simultaneous detection of *Pseudomonas fragi*, *P. lundensis*, and *P. putida* from meat by use of a multiplex PCR assay targeting the *carA* gene. *Applied and environmental microbiology*. 2007. Vol. 73. № 7. P. 2354–2359.
7. Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*. 1985. Vol. 39. № 4. P. 783–791.
8. Geest L.P.S. van der, Bruin J. Diseases of mites and ticks: from basic pathology to microbial control — an introduction. *Experimental & applied acarology*. 2008. Vol. 46. № 1–4. P. 3–6.
9. Gotoh T., Noda H., Ito S. *Cardinium* symbionts cause cytoplasmic incompatibility in spider mites. *Heredity*. 2007. Vol. 98. № 1. P. 13–20.
10. Hall T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp.* 1999. Ser. V. 41. P. 95–98.
11. Hosokawa T., Kikuchi Y., Shimada M., Fukatsu T. Obligate symbiont involved in pest status of host insect. *Proceedings. Biological sciences. The Royal Society*. 2007. Vol. 274. № 1621. P. 1979–1984.
12. Hubert J., Kopecký J., Perotti M.A., Nesvorná M., Braig H.R., Ságová-Marečková M., Macovei L., Zurek L. Detection and identification of species-specific bacteria associated with synanthropic mites. *Microbial ecology*. 2012. Vol. 63. № 4. P. 919–928.
13. Jiang H., Dong H., Zhang G., Yu B., Chapman L.R., Fields M.W. Microbial diversity in water and sediment of Lake Chaka, an athalassohaline lake in northwestern China. *Applied and environmental microbiology*. 2006. Vol. 72. № 6. P. 3832–3845.
14. Kikuchi Y., Hayatsu M., Hosokawa T., Nagayama A., Tago K., Fukatsu T. Symbiont-mediated insecticide resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2012. Vol. 109. № 22. P. 8618–8622.
15. Kilian M., Heine-Jensen J., Bülow P. *Haemophilus* in the Upper Respiratory Tract of Children. *Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica Section B Microbiology and Immunology*. 2009. Vol. 80B. № 4. P. 571–578.
16. Nadarasah G., Stavrinides J. Insects as alternative hosts for phytopathogenic bacteria. *FEMS microbiology reviews*. 2011. Vol. 35. № 3. P. 555–575.
17. Nei M., Kumar S. *Molecular Evolution and Phylogenetics*. New York: Oxford University Press. 2000. 333 p.
18. Nyholm S.V., McFall-Ngai M.J. The winnowing: establishing the squid-vibrio symbiosis. *Nature reviews. Microbiology*. 2004. Vol. 2. № 8. P. 632–642.

19. *Sachs J.L., Essenberg C.J., Turcotte M.M.* New paradigms for the evolution of beneficial infections. *Trends in ecology & evolution*. 2011. Vol. 26. № 4. P. 202–209.
20. *Saitou N., Nei M.* The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees // *Molecular biology and evolution*. 1987. V. 4. № 4. P. 406–425.
21. *Sanger F., Coulson A.R.* A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase // *Journal of molecular biology*. 1975. V. 94. № 3. P. 441–448.
22. *Stouthamer R., Breeuwer J.A., Hurst G.D.* *Wolbachia pipientis*: microbial manipulator of arthropod reproduction. *Annual review of microbiology*. 1999. Vol. 53. P. 71–102.
23. *Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipinski A., Kumar S.* MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular biology and evolution*. 2013. Vol. 30. № 12. P. 2725–2729.
24. *Thompson J.D., Gibson T.J., Plewniak F., Jeanmougin F., Higgins D.G.* The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic acids research*. 1997. Vol. 25. № 24. P. 4876–4882.
25. *Toft C., Andersson S.G.E.* Evolutionary microbial genomics: insights into bacterial host adaptation. *Nature reviews. Genetics*. 2010. Vol. 11. № 7. P. 465–475.
26. *Weeks A.R., Turelli M., Harcombe W.R., Reynolds K.T., Hoffmann A.A.* From parasite to mutualist: rapid evolution of *Wolbachia* in natural populations of *Drosophila*. *PLoS biology*. 2007. Vol. 5. № 5. P. 114.
27. *Weeks A.R., Velten R., Stouthamer R.* Incidence of a new sex-ratio-distorting endosymbiotic bacterium among arthropods. *Proceedings. Biological sciences. The Royal Society*. 2003. Vol. 270. № 1526. P. 1857–1865.
28. *Wright E.S., Yilmaz L.S., Ram S., Gasser J.M., Harrington G.W., Noguera D.R.* Exploiting extension bias in polymerase chain reaction to improve primer specificity in ensembles of nearly identical DNA templates. *Environmental microbiology*. 2014. Vol. 16. № 5. P. 1354–1365.
29. *Yoon C.* Bacterial Diversity and Distribution from the Whole Mite Extracts in Acaricide Resistant and Susceptible Populations of Twospotted Spider Mite–*Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*. 2010. Vol. 53. № 4. P. 446–457.
30. *Zhao D.-X., Chen D.-S., Ge C., Gotoh T., Hong X.-Y.* Multiple Infections with *Cardinium* and Two Strains of *Wolbachia* in The Spider Mite *Tetranychus phaselus* Ehara: Revealing New Forces Driving the Spread of *Wolbachia*. *PLoS ONE*. 2013. Vol. 8. № 1. P. 549–64.

**Коноплев Никита Дмитриевич** — асп. кафедры защиты растений. РГАУ-МСХА имени К. А. Тимирязева (127550, Россия, Москва, ул. Тимирязевская, 49; тел.: (903) 295-35-86; e-mail: konoplev.nd@gmail.com)

**Игнатов Александр Николаевич** — д. б. н., проф., зам. генерального директора ООО ИЦ «ФитоИнженерия» (141080, Россия, Московская обл. Дмитровский р-н. с. Рогачево, ул. Московская, 58; тел.: (916) 671-21-47; e-mail: an.ignatov@gmail.com).

**Попов Сергей Яковлевич** — д. б. н., проф., зав. кафедрой защиты растений РГАУ-МСХА имени К. А. Тимирязева (127550, Россия, Москва, ул. Тимирязевская, 49; тел.: (916) 474-97-26; sergei\_ya\_popov@mail.ru).

**Konoplev Nikita Dmitrievich** — PhD-student of the Department of Plant Protection, Russian Timiryazev State Agrarian University (127550, Moscow, Timiryazevskaya str., 49; tel.: +7 (903) 295-35-86; e-mail: konoplev.nd@gmail.com).

**Ignatov Alexander Nikolaevich** — Doctor of Biological Sciences, Professor, Deputy General Director of «Phytoengineering» R&D Center (141880, Moscow Region, Dmitrov district, Rogachevo, Moskovskaya str., 58; tel.: +7 (916) 671-21-47; e-mail: an.ignatov@gmail.com).

**Popov Sergei Yakovlevich** — Head of the Department of Plant Protection, Russian Timiryazev State Agrarian University (127550, Moscow, Timiryazevskaya str., 49; tel.: +7 (916) 474-97-26; e-mail: sergei\_ya\_popov@mail.ru).