

УДК 595.79

МОРФО-ЭКОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ПРЕИМАГИНАЛЬНЫХ СТАДИЙ РАЗВИТИЯ НАЕЗДНИКА *MINOTETRASTICHUS FRONTALIS* (NEES, 1834) (INSECTA, HYMENOPTERA, EULOPHIDAE)

© 2016 г. А. В. Мищенко, Н. А. Ленгесова, Н. Г. Куклина, О. М. Костина, А. В. Соловьев, Е. И. Антонова, Л. В. Омелянчук*

Научно-исследовательский центр фундаментальных и прикладных проблем биоэкологии и биотехнологии
Ульяновского государственного педагогического университета имени И.Н. Ульянова
432700 Ульяновск, пл. 100-летия со дня рождения В.И. Ленина, 4

*Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН
630090 Новосибирск, пр. Академика Лаврентьева, д. 8, корп. 2
E-mail: a.misch@mail.ru

Поступила в редакцию 15.07.2015 г.

Окончательный вариант получен 20.11.2015 г.

Исследование посвящено изучению морфологии и биологии преимагинальных стадий развития наездника *Minotetrastichus frontalis*. Выявлены морфологические особенности яиц и личинок, особенности взаимодействия наездника с хозяином — *Phyllonorycter issikii* и другие биологические характеристики. Для видовой идентификации изучаемых экземпляров насекомых проведен молекулярно-генетический анализ; молекулярным маркером послужил фрагмент ядерного гена 28S РНК. В результате выявлен сильный генетический полиморфизм популяций изучаемого вида по выбранному маркеру.

Ключевые слова: морфология, молекулярно-генетический анализ, баркодинг, гистологическое строение, листовые минеры, наездники-эвлофиды, преимагинальные стадии, энтомофаги.

DOI: 10.7868/S0475145016030046

ВВЕДЕНИЕ

Многие виды растительноядных насекомых, подвергающихся заражению эвлофидами, являются вредителями лесного и сельского хозяйства, поскольку используют в качестве кормовых растений различные хозяйственно значимые растения. Особую группу фитофагов составляют минеры, личинки которых развиваются скрыто в растительных тканях (например, в мезофилле листа), образуя часто видоспецифичные повреждения — мины. Эвлофиды способны заражать минеров, находящихся внутри минирующих повреждений и не доступных другим видам энтомофагов, тем самым обеспечивая биологическую защиту культурных и дикорастущих растений. Поскольку паразитическими являются именно личинки наездников, изучение деталей их морфологии и развития на хозяине-минере позволит определить, какие биологические особенности позволяют им эффективно сдерживать численность вредоносных фитофагов. Скрытый образ жизни наездников (их личинки развиваются внутри мин хозяев), малые размеры, и, соответственно, трудность нахождения в природе объясняют слабую изученность преимагинального развития этой важной

группы перепончатокрылых насекомых. Настоящее исследование посвящено исследованию преимагинальных стадий наездника *Minotetrastichus frontalis*.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Для решения поставленных задач на территории Ульяновской области (с 54° по 52° с.ш., с 49° по 46° в.д.) проводили сбор листовых мин с развивающимися на хозяине наездниками в период с мая по июль 2014 года. Были изучены преимагинальные стадии наездника *M. frontalis*, паразитирующих на молях-пестрянках *Phyllonorycter issikii* (Lepidoptera: Gracillariidae). Листовые мины, образуемые гусеницами этого вида чешуекрылых, выбраны для изучения стадий развития наездников из-за удобства лабораторного содержания, а также в связи с тем, что пятновидные минирующие повреждения данного минера хорошо заметны на кормовом растении. Гусеницы образуют объемную камеру мины, и все преимагинальные стадии хозяин проходит внутри листа. При обработке собранного в природе материала мины вскрывались и на зараженном хозяине определялись развивающиеся паразиты на разных преимагинальных стадиях: яйцо, личинка, куколка, ко-

торые далее в лабораторных условиях развивались до стадии имаго. Имаго наездников определялись на основе работ М. Грехема (Graham, 1959) и В.А. Тряпичына (1978). В дальнейшем изучаемый нами вид эвлофид подсаживался в садки с листьями липы, несущими минирующие повреждения молей *Ph. issikii*.

При лабораторном разведении создавались особые условия для выживания и развития эвлофид: минируемые листья во избежание увядания находились в термостате при температуре 25°C и влажности воздуха не менее 95%. Мины вскрывались, и с равной периодичностью (через каждые 12–24 часа) проводилась фиксация преимагинальных стадий развития наездника; изучение проводилось с использованием стереоскопического микроскопа MC-2 ZOOM с комплектом визуализации на базе фотокамеры Canon 650D. Для прямой микроскопии и изучения деталей строения наездников применялся микроскоп Микромед-3.

Морфологический (гистологический) анализ. Личинки наездников-эвлофид фиксировали в 4% формалине с добавлением глицерина. Заливали в парафин, готовили серийные срезы, окрашивали гематоксилин-эозином. Пространственную организацию изучали с использованием микроскопа Axio Imager.A2 (Carl Zeiss, Германия). Фотосъемка проводилась с использованием цветной цифровой камеры AxioCamMRC 5, а также сканера Panoramic Desk (3D HISTECH).

Молекулярно-генетический анализ. В качестве молекулярного маркера использовался фрагмент гена 28S рибосомальной РНК.

Выделение ДНК. Экстракцию ДНК проводили с использованием набора GeneJET Genomic DNA Purification Kit (Thermo Scientific) в соответствии с протоколом изготовителя. Образцы гомогенизировались пластиковыми пестиками в пробирках типа Эппендорф на 1.5 мл и помещались для инкубации в литический раствор (Lysis Solution, Thermo Scientific), содержащий протеиназу К. Далее проводилось выделение нуклеиновых кислот на силиконовых колонках.

Аmplификация ДНК. Для полимеразной цепной реакции использовали следующий состав реакционной смеси (на 20 мкл): *Taq*-буфер (1×), праймеры (по 0.5 мкМ каждого), dNTP (250 мкМ), *Taq*-полимераза (10 ед.), ДНК-матрица (1 мкл), деионизированная вода (до финального объема). Амплификацию проводили с использованием термоциклера qTOWER 2.2 (Analytik Jena) при температурных параметрах: денатурация ДНК – 95°C, 2 мин; 30 циклов при условиях: денатурация ДНК – 95°C, 30 с, отжиг праймеров – 55°C, 30 с, элонгация – 72°C, 40 с; достройка цепей – 72°C, 3 мин.

В работе использовали праймеры: ACCCGCT-GAATTTAAGCATAT (прямой) и TTGGTCCGT-GTTTCAAGACGG (обратный) (Gumovsky, 2011).

Электрофорез. Оценку результатов амплификации ДНК и разделение фрагментов проводили в 1% аналитическом агарозном геле, после чего готовился препаративный гель, из которого проводили выделение и очистку интересующего фрагмента (при помощи набора GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo Scientific)).

Секвенирование. Сиквенсовая реакция проводилась с использованием коммерческого набора реактивов BigDye Terminator v. 3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) согласно протоколу производителя. Очистка продуктов сиквенсовой реакции проводилась с использованием набора BigDye XTerminator v. 3.1 Purification Kit. Секвенирование выполнено на генетическом анализаторе ABI PRISM 3500 (Life Technologies).

Филогенетический анализ был использован для подтверждения идентификации изучаемого энтомофага. Филогенетическое дерево построено с использованием алгоритма Minimum Evolution с использованием программы Mega 6.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Собранный нами в природе материал анализировали на предмет количества мин, зараженных гусениц-хозяев, личинок паразита. Так, в частности, проанализировано 100 мин на листовых пластинках липы и 27 зараженных гусениц, из которых выведено 26 паразитических перепончаток крылых вида *M. frontalis*.

Были выявлены следующие морфологические особенности преимагинальных стадий развития изучаемого вида.

Яйца имеют овальную форму, размер не более 0.3–0.4 мм в длину, гладкие, без каких-либо прикрепительных структур (рис. 1а). Размер на разных полюсах составляет от 0.05–0.06 до 0.04 мм. Наружный слой образован хорионом, отделенным от зародыша эмбриональной кутикулой. Эмбриональное развитие длилось не более 3-х дней, по истечению которых личинка выходила из яйца и начинала питаться гемолимфой хозяина. Морфологически тело личинки состоит из 13 относительно одинаковых сегментов и головного отдела (рис. 1б). Голова, как правило, хорошо обособлена от тела, конусовидной формы, капсула которой слабо хитинизирована. В отсутствие зрительной сенсорной системы большое значение в ориентации личинки паразита внутри мины и на теле хозяина приобретают чувствительные структуры, которые располагаются попарно, окружая ротовое отверстие: пара выдающихся вперед антенн и три пары мелких чувствительных сенсилл на вентральной поверхности головы (рис. 1б). Ротовые органы – мандибулы, сильно хитинизированы, состоят из широкого основания, фиксирующего челюсти к головной капсуле, и узкой саблевид-

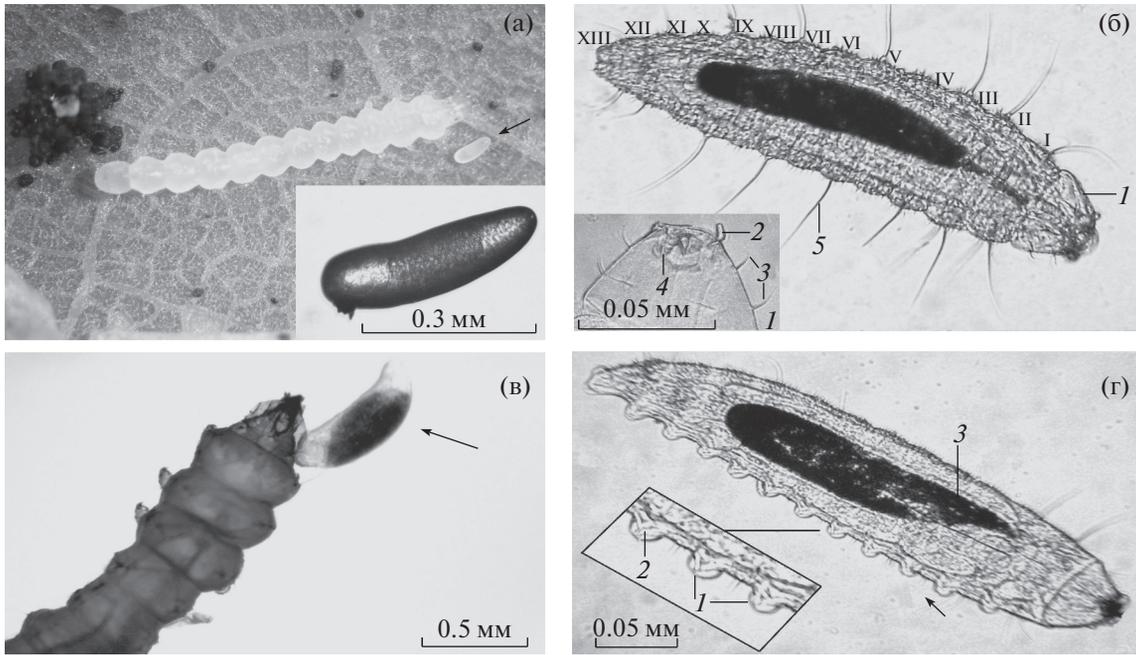


Рис. 1. Морфология преимагинальных стадий *M. frontalis*: а – яйцо наездника рядом с гусеницей хозяина (указано стрелкой; в правом нижнем углу – увеличение при просвечивающей микроскопии); б – личинка наездника *M. frontalis* на ранней стадии развития (в левом нижнем углу – увеличение при просвечивающей микроскопии; I–XIII – сегменты тела; 1 – голова; 2 – антенна; 3 – сенсиллы; 4 – мандибулы; 5 – локомоторный волосок); в – эктопаразитизм личинки наездника (указана стрелкой) на гусенице хозяина; г – личинка с латеральной стороны (стрелкой указана дорсальная часть; 1 – выросты сегментов; 2 – сократимый филамент; 3 – кишечник).

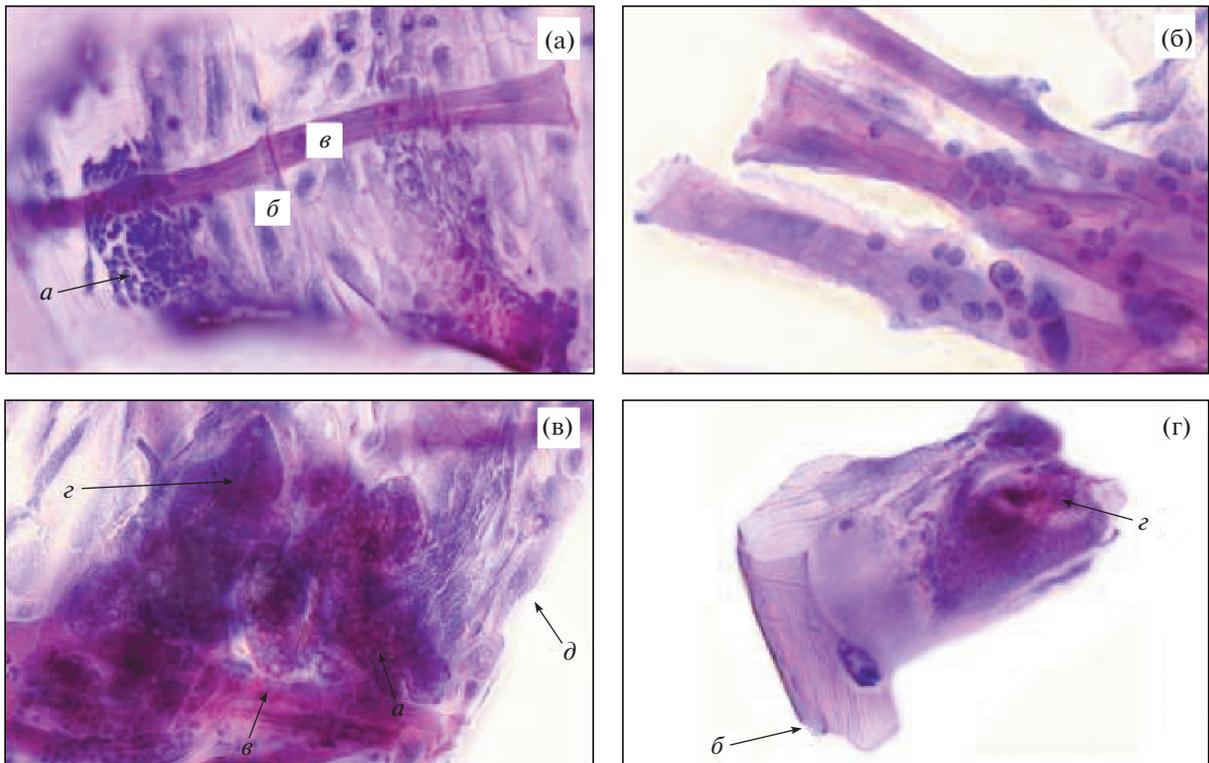


Рис. 2. Личинка *M. frontalis*. Окраска гематоксилин-эозин. а, в – поперечнополосатые мышечные волокна кольцевые (а), продольные (б), диагональные (в). б – продольное мышечное волокно. г – полость кишечника.

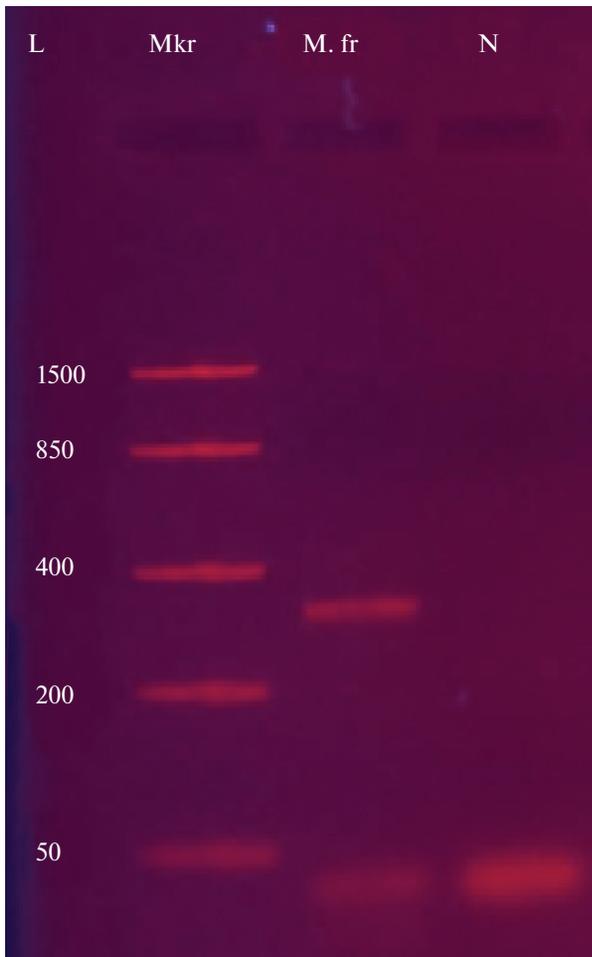


Рис. 3. Результаты аналитического агарозного геле-электрофореза ПЦР-продукта, содержащего амплифицированный фрагмент гена 28S рибосомальной РНК наездника *M. frontalis* (фото выполнено с помощью геле-документирующей системы BioDocAnalyze (Analytik Jena). Обозначения: L – длина маркера (в п.н.), Mkr – фрагменты ДНК-маркера, M.fr – фрагмент гена 28S рибосомальной РНК, N – отрицательный контроль.

ной, слегка изогнутой колющей части (рис. 1б). Личинки активно всасывают гемолимфу хозяина через повреждения кутикулы, наносимых мандибулами (рис. 1в). За 5 дней личинка увеличивается в размерах более чем в 5 раз.

У изучаемых нами личинок вида *M. frontalis* на сегментах имеются двигательные волоски, что не было прежде отмечено для эвлофид. Двигательные волоски расположены попарно с обеих сторон на I–III грудном сегменте, а на брюшных сегментах (с IV по XIII) придатки располагаются только на нечетных (рис. 1б). По всей видимости, данные двигательные структуры позволяют личинкам наездника эффективно перемещаться по телу хозяина, меняя участки для питания (Мищенко, 2011а, 2011б, 2012а, 2012б). Помимо двига-

тельных волосков, на дорсальных и вентральных участках сегментов обнаружены относительно небольшие выросты (рис. 1г). На поздней стадии развития хорошо выражена трахейная система. Наиболее крупными являются два латеральных ствола, идущие справа и слева по боковым сторонам тела через все сегменты под покровами личинки. Под углом около 45° к продольной оси тела, в миксоцеле, между покровами и стенкой кишки, косыми полосками располагаются жировые тела, сгруппированные в продольные ряды по 8–10. Большую часть объема тела личинки занимает кишечник (рис. 1б). Эпителий кишечника образован относительно крупными клетками (рис. 2). После опорожнения кишечника у формирующейся предкуколки начинаются интенсивные процессы гистолиза и морфологических перестроек сегментов. Сегментация становится гетерономной: четко выделяется краниальная часть, расширяются и увеличиваются в размерах грудные сегменты, брюшные же, напротив, становятся более узкими, граница между ними постепенно сглаживается, начинается фрагментация жировых тел и мобилизация накопленных в них питательных веществ.

Куколка формируется менее чем за 24 часа после прекращения личинкой питания и потери подвижности. На поздних стадиях покровы, как правило, темнеют, становятся коричневыми, либо черными, сильно хитинизируются.

На гистологических срезах хорошо видно поперечнополосатое мышечное волокно покрытое сарколеммой, которая, как и у позвоночных, состоит из миофибрилл, погруженных в саркоплазму. Поперечная полосатость связана со структурой миофибрилл, которые состоят из чередующихся темного анизотропного и светлого изотропного веществ (рис. 2г). Каждый изотропный участок перегорожен поперек тонкой телофрагмой (z полоска или мембраны Краузе) (рис. 2в). У личинок фибрилл сравнительно мало (рис. 2б), так что периферический слой саркоплазмы толст, а ядра лежат в один ряд в центре по всей толщине волокна. Мышечные волокна представлены тремя слоями – кольцевые, продольные и диагональные (рис. 2а). Саркоплазматическая ядродержащая часть мышечных волокон представлена некрупным ядром, характеризующимся высоким содержанием гетерохроматина (рис. 2г).

Для видовой идентификации был проведен молекулярно-генетический анализ с построением филогенетического дерева. Проведенный геле-электрофорез показал специфичность используемых праймеров, а также хороший выход ДНК при выделении (рис. 3). Получена последовательность участка ядерного гена 28S рибосомальной РНК наездника *M. frontalis*. Из полученного сиквенса был вырезан фрагмент с Pure Base

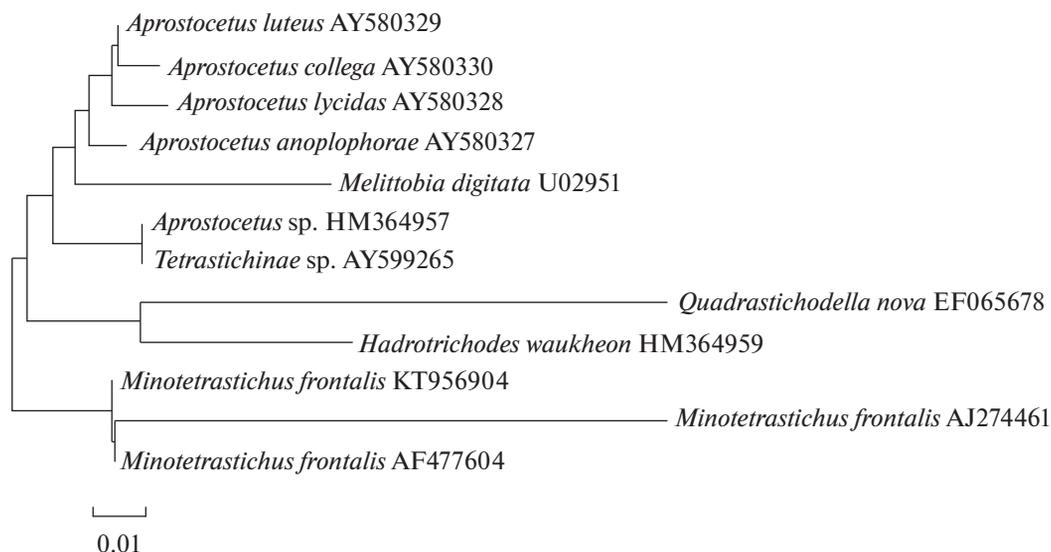


Рис. 4. Филогенетическое дерево.

Quality Value более 20 длиной 316 п.о. Представленный фрагмент проанализирован и отредактирован при помощи компьютерной программы Sequence Scanner 2 (Life Technologies Corporation) и депонирован в базу данных GenBank с номером KT956904. Полученную последовательность гена 28S рибосомальной РНК сравнивали с последовательностями, которые находятся в GenBank. При филогенетическом анализе в качестве внешней группы были выбраны виды родов *Aprostocetus*, *Hadrotrichodes*, *Quadrastichodella* и *Melittobia*, размещенные в базе данных. Идентификационные номера в системе GenBank у включенных в анализ экземпляров показаны на филогенетическом дереве (рис. 4).

В настоящее время все большую значимость при идентификации биологических видов, их генетическом типировании, систематике и филогении приобретает молекулярно-генетический анализ последовательностей определенных генов. Исследование ДНК позволяет с высокой степенью достоверности различать виды-двойники, определять насекомых на разных стадиях развития, пересматривать систематическое положение отдельных видов и групп видов, а также по-новому рассматривать их филогенетические связи. В данной статье предпринята попытка определения видовой принадлежности важного с точки зрения биологического контроля вредителей наездника *M. frontalis* на основе фрагмента ядерного гена. Мы показали, что полученный нами фрагмент 28S РНК вида *M. frontalis*, собранного на территории Ульяновской области, полностью идентичен фрагменту AJ274461, который изучался в работе Gauthier et al. (2000). В то же время, последовательность AF477604, полученная Lopez-Vaamonde et al.

(2005) отличается от нашей 7-ю точечными заменами, двумя однонуклеотидными делециями и одной однонуклеотидной вставкой. Как известно, 28S РНК является эволюционно-консервативной молекулой. Так, к примеру, на филогенетических деревьях, построенных в работе Lopez-Vaamonde et al. (2005), многие виды по изучаемому фрагменту различаются меньше, чем по 10 позициям фрагмента. Тем не менее, экземпляр, изученный нами, имеет большое число отличий по сравнению с AF477604. Это может быть свидетельством того, что рассматриваемый вид является генетически крайне полиморфным, и представлен крайне обособленными популяциями. Следует также отметить, что последовательность AF477604, которая аннотирована в базе данных GenBank как результат работы Lopez-Vaamonde et al. (2005), в самой работе не упоминается. Исходя из раздела “Материалы и методы” этой работы, можно лишь предположить, что материал был собран в Англии. Последовательность же AJ274461 определенно происходит от экземпляра, найденного на территории Англии, и упоминается в тексте работы Gauthier et al. (2000).

Дальнейшие молекулярно-генетические исследования хозяйственно значимых видов энтомофагов и фитофагов позволят создать для нашего региона генетическую базу данных, доступную для широкого круга исследователей-энтомологов и специалистов по защите растений; что позволит в дальнейшем проводить достоверную идентификацию различных видов насекомых-вредителей и подавляющих их численность паразитических и хищных членистоногих.

Изучение данного вида наездника является перспективным в плане биологического контроля численности минирующих насекомых как альтернатива химическим методам борьбы с вредителями, так как вид способен уничтожать скрытоживущих фитофагов, недоступных другим хищникам и паразитам. Планируется дальнейшее исследование данного вида с привлечением комплекса методов с позиции анализа тканевого гомеостаза, гормонального статуса, электронно-микроскопического исследования в норме и в условиях теплового стресса.

БЛАГОДАРНОСТИ

Исследование выполнено при финансовой поддержке департамента науки и технологий Министерства образования и науки Российской Федерации (номер государственной регистрации ЕГИСУ НИОКР: 114100740051), в рамках проектной части государственного задания в сфере научной деятельности № 06.2547.2014/К.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Мищенко А.В. Энтомофауна листовых мин // Вестник Томского государственного педагогического университета. 2011а. Вып. 5 (107). С. 101–106.
- Мищенко А.В. Морфологические особенности личинок паразитического наездника *Minotetrastichus frontalis* (Nees) (Hymenoptera: Eulophidae) // Прикладная энтомология. 2011б. Вып. 4 (6). С. 32–35.
- Мищенко А.В. Особенности преимагинального развития наездника *Minotetrastichus frontalis* (Nees) (Hymenoptera, Eulophidae) // Энтомологическое обозрение. 2012а. Т. 91. № 1. С. 58–62.
- Мищенко А.В. Хальцидоидные наездники (Hymenoptera: Chalcidoidea) с разными типами паразитизма, заражающие гусениц и куколок дубовой моли-пестрянки *Phyllonorycter roboris* (Zeller, 1839) (Lepidoptera: Gracillariidae) на юго-западе Краснодарского края // Кавказский энтомологический бюллетень. 2012б. Т. 8. Вып. 1. С. 155–158.
- Тряпицын В.А. Надсемейство Chalcidoidea / Определитель насекомых Европейской части СССР. Т. 3. Ч. 2. Л.: Наука, 1978. С. 28–538.
- Graham M.W.R. de V. Keys to the British genera and species of Elachertinae, Eulophinae, Entedontinae and Euderinae (Hymenoptera, Chalcidoidea) // Transactions of the Society for British Entomology. 1959. V. 13. P. 169–204.
- Gumovsky A.V. Molecular data support the existence of four main lineages in the phylogeny of Eulophidae (Hymenoptera) // Russian Entomological Journal. 2011. V. 20. № 3. P. 273–286.
- Gauthier N., LaSalie J., Quick D.L.J., Godfrey H.C.J. Phylogeny of Eulophidae (Hymenoptera: Chalcidoidea) with a reclassification of Eulophinae and the recognition that Elasmidae are derived eulophids // Journal Syst. Entomol. 2000. V. 25. Is. 24. P. 521–539.
- Lopez-Vaamonde C., Godfray H.C.J., West S.A., Hansson C., Cook J.M. The evolution of host use and unusual reproductive strategies in *Achrysocharoides* parasitoid wasps // J. Evol. Biol. 2005. V. 18. Is. 4. P. 1029–1041.

Morphoecological Aspects of Preimaginal Stages of Development of the Parasitic Wasp *Minotetrastichus frontalis* (Nees, 1834) (Insecta, Hymenoptera, Eulophidae)

A. V. Mishchenko^a, N. A. Lengesova^a, N. G. Kuklina^a, O. M. Kostina^a,
A. V. Solov'ev^a, E. I. Antonova^a, and L. V. Omelyanchuk^b

^aResearch Center for Basic and Applied Problems of Bioecology and Biotechnology, Ulyanovsk State Pedagogical University, pl. 100-letiya so dnya rozhdeniya V.I. Lenina 4, Ulyanovsk, 432700 Russia

^bInstitute of Molecular and Cellular Biology, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, pr. Akademika Lavrent'eva 8, Novosibirsk, 2630090 Russia
e-mail: a.misch@mail.ru

Received July 15, 2015; in final form, November 20, 2015

Abstract—This work is devoted to studying the morphology and biology of preimaginal stages of development of the parasitic wasp *Minotetrastichus frontalis*. The morphological characteristics of eggs and larvae, the features of interaction of the parasitic wasp with the host (*Phyllonorycter issikii*), and other biological characteristics were determined. For the species identification of the studied specimens of insects, we performed molecular genetic analysis using a nuclear 28S RNA gene fragment as a molecular marker. The result showed a strong genetic polymorphism of the populations of the studied species for the selected marker.

Keywords: morphology, molecular genetic analysis, barkoding, histological structure, leafminers, eulophid parasitic wasps, preimaginal stages, entomophages