



Анализ табл. 3 показывает, что более высокий коэффициент переваримости наблюдается на территориях, относящихся к участку межозерной водораздельной равнины.

Таким образом, на основании проведенной работы установлено, что преобладающими растениями в рационе сайгака являются прутняк стелющийся, полыни spp., мятлик луковичный, солянки spp.; на разных пастбищах рацион включает небольшое количество растений, характерных для фитоценозов на исследуемых участках. Расчет переваримости по полученным данным показал, что наиболее высокие результаты этого параметра наблюдаются на пастбищах, расположенных на участке межозерной водораздельной равнины подзоны полупустыни (Западный Казахстан).

Список литературы

1. Абатуров Б. Д., Ларионов К. О., Колесников М. П., Никонова О. А. Состояние и обеспеченность сайгаков (*Saiga tatarica*) кормом на пастбищах с растительностью разных типов // Зоол. журн. 2005а. Т. 84, № 3. С. 377–390.
2. URL: http://www.cms.int/documents/appendix/appendices_e.pdf (дата обращения: 10.10.2012).
3. Stewart D. R. M. Analysis of plant epidermis in faeces : a technique for studying the food preferences of grazing herbivores // J. Appl. Ecol. 1967. Vol. 4. P. 83–111.
4. Helle P. Food composition and feeding habits of the roe deer in winter in central Finland // Acta theriol. 1980. Vol. 25, № 32–42. P. 395–402.
5. Абатуров Б. Д., Петрицев Б. И. Сравнительная оценка рациона свободнопасущего сайгака (*Saiga tatarica*) микроскопическим анализом растительных остатков в фекалиях и визуальным подсчетом поедаемых растений // Зоол. журн. 1998. Т. 77, № 2. С. 964–970.
6. Розенфельд С. Б. Атлас микрофотографий кутикулярной структуры эпидермиса кормовых растений позвоночных фитофагов тундровой и степной зон Евразии. М. : Тов. науч. изд. КМК, 2011. С. 5.
7. Ларионов К. О. Питание и обеспеченность сайгаков (*Saiga tatarica*) кормом в зависимости от особенностей растительности на пастбищах : автореф. дис. ... канд. биол. наук. М., 2008. С. 25.
8. Ларионов К. О., Быков А. В., Вышивкин А. А., Шадрин М. Б. Питание общественных полевок на раннем этапе заселения зональной равнины в глинистой полупустыне Заволжья // Поволж. экол. журн. 2010. № 2. С. 160–165.
9. Абатуров Б. Д. Кормовые ресурсы, обеспеченность пищей и жизнеспособность популяций растительноядных млекопитающих // Зоол. журн. 2005. Т. 84, № 10. С. 1251–1271.
10. Абатуров Б. Д., Колесников М. П., Никонова О. А., Позднякова М. К. Опыт количественной оценки питания свободнопасущихся млекопитающих в естественной среде обитания // Зоол. журн. 2003. Т. 82, № 1. С. 104–114.
11. Доскач А. Г. Природное районирование Прикаспийской полупустыни. М. : Наука, 1979. С. 73–79, 141.
12. Абатуров Б. Д. Кормовые ресурсы, особенности питания и жизнеспособность популяций растительноядных млекопитающих на степных пастбищах // Зоологические и охотоведческие исследования в Казахстане и сопредельных странах : материалы междунар. науч.-практ. конф. Алматы, 2012. С. 6–9.
13. Сапанов М. К., Сиземская М. Л. Климатогенные изменения травянистой растительности на солончаковых солонцах северного Прикаспия // Поволж. экол. журн. 2010. № 2. С. 185–194.

УДК 632.752.2 (470.44)

БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА БАКТЕРИЙ-АССОЦИАНТОВ ВИШНЁВОЙ ТЛИ (*MYZUS CERASI* F., 1775) (INSECTA: HOMOPTERA, APHIDIDAE)

М. С. Малышина, А. М. Петерсон, Е. В. Глинская

Саратовский государственный университет
E-mail: elenavg-2007@yandex.ru

Проведено изучение биологических свойств бактерий-ассоциантов вишне́вой тли (*Myzus cerasi* F., 1775) на территории Саратовской области. Выделено 39 штаммов бактерий. 66.6% штаммов были способны к использованию глюкозы, 87.0% – фиксировали молекулярный азот, 56.3% – обладали способностью к росту при 10 °С, 92.1% выделенных культур являлись алкалолентными и росли при pH10.

Ключевые слова: бактерии-ассоцианты, вишневая тля, Саратовская область.



Biological Properties of Bacteria-associants (*Myzus cerasi* F., 1775) (Insecta: Homoptera, Aphididae)

M. S. Malyshina, A. M. Peterson, E. V. Glinskaya

The biological properties of bacteria-associants *Myzus cerasi* F. in territory of the Saratov region were studied. 39 strains of bacteria were revealed. 66.6% of the strains were able to use glucose, 87.0% – fixed molecular nitrogen, 56.3% – had the ability to



grow at 10 °C, 92.1% of the isolated cultures were alkalotolerant and grown at pH10.

Key words: bacteria-associants, *Myzus cerasi*, Saratov region.

Питаясь исключительно соками растений, тли испытывают постоянный недостаток многих аминокислот и витаминов. Эти жизненно важные вещества насекомые получают благодаря своим симбиотическим микроорганизмам. Наиболее изученными облигатными симбионтами тлей являются бактерии рода *Buchnera*, обитающие в специальных клетках насекомого – бактериоцитах и играющие ключевую роль в питании тли, обеспечивая своего хозяина необходимыми аминокислотами [1–4]. В последние годы внимание исследователей стали привлекать и факультативные симбионты тли. Установлено, что бактерии *Hamiltonella defensa*, *Regiella insecticola*, *Serratia symbiotica* наряду с *Buchnera* обеспечивают толерантность насекомых к высоким температурам [5], а совместное действие *Hamiltonella defensa* с *Serratia symbiotica* повышает в разы устойчивость к естественным врагам – наездникам (*Aphidius ervi*) [6]. Факультативные симбионты могут передаваться как по вертикали, так и по горизонтали в пределах одного вида и между видами, что приводит к быстрому приобретению насекомыми экологически важных качеств [7].

Микробиологические исследования различных видов тли, проведенные нами в последние годы [8, 9], показали, что внутренняя среда этих насекомых имеет сложную и динамичную микробную ассоциацию. Однако роль ассоциативных бактерий в жизни своих хозяев пока не ясна. В связи с этим целью данной работы стало изучение биологических свойств бактерий-ассоциантов вишнёвой тли.

Материалы и методы

В качестве объекта исследования была выбрана вишнёвая тля (*Myzus cerasi* F.), которая является широко распространённым вредителем садовых культур в зоне возделывания главных кормовых растений этих насекомых – вишни и черешни. В результате питания тлей рост листьев и побегов задерживается, листья в верхней части побега скручиваются, покрываются сахаристыми выделениями тлей, зимостойкость и урожайность поврежденных кустов снижаются [10].

Самки вишнёвой тли собирались в Левобережье и Правобережье Саратовской области в мае – июле 2011–2012 гг. Всего было исследовано 600 особей тлей. Непосредственно перед бактериологическим посевом насекомых усыпляли, обрабатывали в 96% этаноле в течение 5 мин для уничтожения микроорганизмов, обитающих на внешних покровах тлей, затем дважды промы-

вали в стерильном физиологическом растворе. 10 экземпляров тлей, обработанных таким образом, растирали в ступке с 0.5 мл физиологического раствора (разведение 10^{-2}). По 0.1 мл полученной суспензии засеивали на ГРМ-агар и картофельную среду. Посевы инкубировали в термостате при 28 °C. Способность микроорганизмов к утилизации углеводов изучали на средах Гисса с добавлением глюкозы, сахарозы, маннита, лактозы, ксилозы, арабинозы, маннозы, сорбита, фруктозы. Выявление способности к азотфиксации проводили на элективной среде Эшби [11], к ассимиляционной нитратредукции – на нитратном бульоне в аэробных условиях [11], к диссимиляционной нитратредукции – на ГРМ-агаре (Россия, Оболенск) с добавлением 0.2% нитратов в анаэробных условиях. Способность к росту при различных значениях pH изучали на ГРМ-агаре с соответствующим водородным показателем (5, 10) [11]. Устойчивость к действию температурного фактора выявляли при культивировании бактерий на ГРМ-агаре при 10 и 43 °C.

Результаты и их обсуждение

В результате микробиологических исследований из организма вишнёвой тли было изолировано 39 штаммов бактерий. На основании изучения морфологических признаков выделенные культуры были распределены на 4 группы (табл. 1).

Таблица 1

Бактерии различных морфологических групп, выделенные из вишнёвой тли в 2011–2012 гг., количество штаммов

Морфологическая группа бактерий	Количество штаммов		
	2011	2012	Всего
Грамотрицательные палочки	6	6	12
Грамположительные неспоровые палочки	5	0	5
Грамположительные споровые палочки	14	6	20
Грамположительные кокки	2	0	2
Всего	27	12	39

Тли питаются флоэмным соком, содержащим высокие концентрации углеводов (прежде всего сахарозы и глюкозы), в связи с чем подвергаются постоянному осмотическому стрессу. Известно несколько механизмов, позволяющих насекомым избегать обезвоживания [12–16]. Можно предположить, что дополнительным осморегуляторным механизмом служит использование избытка сахаров бактериями-ассоциантами пищеварительного канала тли. Нами была проанализирована способность выделенных штаммов к использованию ряда углеводов (табл. 2).



Таблица 2

Сахаролитическая активность бактерий-ассоциантов вишнёвой тли, % штаммов, способных использовать данный углевод

Морфологическая группа бактерий	Углевод						
	Глюкоза	Сахароза	Маннит	Лактоза	Арабиноза	Ксилоза	Манноза
Грамотрицательные палочки	28.2	25.6	23.0	5.1	12.8	17.9	25.6
Грамположительные неспоровые палочки	7.7	5.1	2.5	0	5.1	5.1	0
Грамположительные споровые палочки	28.2	17.9	2.5	0	2.5	0	2.5
Грамположительные кокки	2.5	0	2.5	0	0	0	0
Всего	66.6	48.6	30.5	5.1	20.4	23.0	28.1

Учитывая, что основными компонентами флоэнного сока являются сахароза и глюкоза, использование этих сахаров бактериями-ассоциантами представляло наибольший интерес. Как видно из табл. 2, именно глюкозу и сахарозу использовала большая часть бактерий-ассоциантов всех морфологических групп. Наиболее высокую сахаролитическую активность проявляли грамотрицательные палочки, причем они имели наиболее широкий спектр используемых углеводов. Помимо глюкозы и сахарозы большинство штаммов грамотрицательных палочек использовали маннозу и маннит. Наиболее многочисленная и разнообразная группа грамположительных споровых палочек обладала умеренной сахаролитической активностью. Более половины штаммов бактерий этой морфологической группы не использовали сахара. Однако количественные показатели таких штаммов не превышали 10^3 КОЕ в пробе, в то время как количественные показатели сахаролитических штаммов достигали 10^6 КОЕ. Таким образом, способность к использованию сахаров

бактериями-ассоциантами может существенно влиять на их концентрацию в пищеварительном канале насекомых.

Важным ресурсом-ограничителем для любого биологического вида является азот. Наиболее остро проблема азотного питания стоит у тлей, питающихся растительным соком, включающим мало азотсодержащих соединений. Известно, что *Buchnera* дополняют рацион насекомых незаменимыми аминокислотами [17]. Однако огромное количество бактерий-ассоциантов, обитающих в пищеварительном канале тли, могли внести определенный вклад в улучшение азотного питания своего хозяина. Так, уже доказана роль азотфиксирующих микроорганизмов в азотном питании некоторых видов муравьев-листорезов [18] и термитов [19]. Бактериальная азотфиксация представляется наиболее вероятным механизмом улучшения азотного питания тли. Это подтвердили и наши исследования азотфиксирующей активности бактерий-ассоциантов *Myzus cerasi* (табл. 3).

Таблица 3

Способность бактерий-ассоциантов вишнёвой тли к трансформации азотсодержащих соединений, % штаммов, способных использовать данные соединения

Морфологическая группа бактерий	Азотсодержащие соединения			
	N ₂	NO ₃		Белки
		ассимиляционная нитратредукция	диссимиляционная нитратредукция	
Грамотрицательные палочки	28.2	28.2	30.7	17.9
Грамположительные неспоровые палочки	12.8	12.8	12.8	2.5
Грамположительные споровые палочки	43.5	46.1	51.2	17.9
Грамположительные кокки	2.5	5.1	5.1	2.5
Всего	87.0	92.2	99.8	40.8

Более 87% всех выделенных штаммов обладали способностью расти за счёт молекулярного азота. Способность к фиксации N₂ была отмечена у всех

морфологических форм бактерий-ассоциантов. В группе грамположительных неспоровых палочек все штаммы оказались способны к фиксации мо-



лекулярного азота. В немногочисленной группе грамположительных кокков половина штаммов фиксировала молекулярный азот. Большое количество азотфиксирующих штаммов отмечено и в доминирующих морфологических группах. Так, 28.2% грамотрицательных палочек и 43.5% грамположительных споровых палочек были способны расти за счёт N₂.

Учитывая, что большая часть ассоциантов тли заселяет пищеварительный канал этих насекомых, возникает вопрос о механизмах поступления молекулярного азота к месту локализации бактерий. Вероятно, свободный азот может поступать в пищеварительный тракт тли путем диффузии через трахеолы, пронизывающие все ткани насекомых или же образовываться непосредственно в пищеварительном тракте в результате микробной диссимиляционной нитратредукции, к которой были способны большинство штаммов бактерий-ассоциантов (см. табл. 3). Известно, что нитрогеназа, участвующая в процессе азотфиксации, синтезируется бактериями только при низкой концентрации более легко усваиваемых источников азота. Растительный сок, заполняющий пищеварительный канал тли, имеет в своем составе крайне мало азотсодержащих соединений, и это вполне может стимулировать синтез нитрогеназы и, как следствие, фиксацию бактериями молекулярного азота.

Для сравнения мы проанализировали способность ассоциативных микроорганизмов к использованию белков – биополимеров, которых в пищеварительном тракте тли крайне мало. Белки могут оказаться в просвете пищеварительного канала в результате гибели части самих бактерий-ассоциантов или в результате отмирания эпителиальных клеток пищеварительного тракта насекомого. Оказалось, что протеолитической активностью обладает 17.9% штаммов как грамотрицательных палочек, так и грамположительных споровых палочек. Грамположительные неспоровые палочки и кокковые формы обладали слабой протеолитической активностью. Таким образом, протеолитическая активность бактерий-ассоциантов была значительно ниже, чем сахаролитическая активность или способность к использованию нитратов, т.е. веществ, которые в больших количествах присутствуют в соке растений.

Тли способны сохранять жизнеспособность в широком диапазоне температур от +1 до +39 °С [20]. Как уже говорилось выше, вклад в термоустойчивость тли вносят как облигатные, так и факультативные симбионты. Однако, если ассоциативные бактерии могут существенно влиять на физиологический статус насекомых, они также должны обладать широким диапазо-

ном температурной устойчивости. Как показали наши исследования, большая часть выделенных штаммов более устойчива к низким температурам. Наиболее психротолерантными оказались грамотрицательные палочки: 28.2% штаммов этой морфологической группы были способны расти при температуре 10 °С и ни один – при 43 °С. Большое количество психротолерантных штаммов отмечено среди грамположительных неспоровых палочек и кокков. Среди грамположительных споровых палочек в равных количествах присутствовали как психротолерантные, так и термотолерантные штаммы (табл. 4). Таким образом, при колебаниях температуры окружающей среды от 10 до 43 °С часть ассоциантов вишнёвой тли будет сохранять метаболическую активность.

Известно, что в пищеварительном канале растительноядных насекомых поддерживается щелочная реакция среды [21]. Следовательно, чтобы успешно существовать в таких условиях микроорганизмы должны быть как минимум алкалотолерантными. Как показали наши исследования, 92.1% штаммов всех морфологических групп оказались способны к росту при pH 10, и 53.7% – при pH 5 (см. табл. 4). Таким образом, алкалотолерантность является еще одним обязательным условием для успешного размножения бактерий в пищеварительном канале тли.

Таблица 4

Диапазон устойчивости бактерий-ассоциантов вишнёвой тли к некоторым физико-химическим факторам, % устойчивых штаммов

Морфологическая группа бактерий	Физико-химический фактор			
	температура, °С		pH	
	10	43	5	10
Грамотрицательные палочки	28.2	0	25.6	30.7
Грамположительные неспоровые палочки	5.1	2.5	5.1	10.2
Грамположительные споровые палочки	20.5	20.5	20.5	46.1
Грамположительные кокки	2.5	0	2.5	5.1
Всего	56.3	23.0	53.7	92.1

Наши исследования показали, что из большого количества видов, попадающих в пищеварительный канал тли из окружающей среды, успешно адаптироваться могут микроорганизмы, физиологические потребности которых будут удовлетворяться в специфических условиях пищеварительного канала насекомого. Эти виды активно размножаются в организме тли, оказывая определённое влияние на своего хозяина.



Список литературы

1. Douglas A. E. Nutritional interactions in insect-microbial symbioses // *Ann. Rev. of Entomol.* 1998. Vol. 43. P. 17–37.
2. Koga R., Tsuchida T., Fukatsu T. Changing partners in an obligate symbiosis: a facultative endosymbiont can compensate for loss of the essential endosymbiont *Buchnera* in an aphid // *Proc. R. Soc.* 2003. Vol. 270. P. 2543–2550.
3. Dunbar H. E., Wilson A. C., Ferguson N. R., Moran N. A. Aphid thermal tolerance is governed by a point mutation in bacterial symbionts // *PLoS Biology.* 2007. Vol. 5. P. 1006–1015.
4. Bermingham J., Wilkinson T. L. The role of intracellular symbiotic bacteria in the amino acid nutrition of embryos from the black bean aphid, *Aphis fabae* // *Entomol. Experiment. et Appl.* 2010. Vol. 134. P. 272–279.
5. Russel J., Moran N. Costs and benefits of symbiont infection in aphids: variation among symbionts and across temperatures // *Proc. R. Soc.* 2006. Vol. 273. P. 603–610.
6. Oliver K. M., Moran N. A., Hunter M. S. Costs and benefits of a superinfection of facultative symbionts in aphids // *Proc. R. Soc.* 2006. Vol. 273. P. 1273–1280.
7. Oliver K. M., Degnan P. H., Burke G. R., Moran N. A. Facultative Symbionts in Aphids and the Horizontal Transfer of Ecologically Important Traits // *Ann. Rev. of Entomol.* 2010. Vol. 55. P. 247–266.
8. Петерсон А. М., Глинская Е. В., Зарезина Д. О., Малышина М. С. Динамика микробоценоза яблонной тли (*Aphis pomi* Deg.) в Саратовской области в 2007–2009 годах // *Энтомол. и паразитол. исследования в Поволжье.* 2010. Вып. 8. С. 96–100.
9. Петерсон А. М., Глинская Е. В., Малышина М. С. Сравнительная характеристика микробных ассоциаций некоторых видов тли в Саратовской области // *Изв. Сарат. ун-та. Нов. сер.* 2011. Т. 11. Сер. Химия. Биология. Экология, вып. 2. С. 63–67.
10. Alford D. V. *Pests of Ornamental Trees, Shrubs and Flowers.* L. : Academic Press Manson Publishing Ltd, 2012. 480 p.
11. Нетрусов А. И., Егорова М. А., Захарчук Л. М., Колотилова Н. Н., Котова И. Б., Семенова Е. В., Татарнинова Н. Ю., Угольцова Н. В., Цавкелова Е. А., Бобкова А. Ф., Богданов А. Г., Данилова И. В., Динариева Т. Ю., Зинченко В. В., Исмаилов А. Д., Кураков А. В., Максимов В. Н., Милько Е. С., Никитина Е. П., Рыжкова Е. П., Семенов А. М., Хомякова Д. В., Чердынцева Т. А., Юдина Т. Г. Практикум по микробиологии / под ред. А. И. Нетрусова. М. : Академия, 2005. 608 с.
12. Wilkinson T. L., Ashfords D. A., Pritchard J., Douglas A. E. Honeydew sugars and osmoregulation in the pea aphid *Acyrtosiphon pisum* // *J. of Experiment. Biology.* 1997. Vol. 200, №11. P. 2137–2143.
13. Malone M., Watson R., Pritchard J. The spittlebug *Philaenus spumarius* feeds from mature xylem at the full hydraulic tension of the transpiration stream // *New Phytologist.* 1999. Vol. 143, № 2. P. 261–271.
14. Ashford D. A., Smith W. A., Douglas A. E. Living on a high sugar diet : the fate of sucrose ingested by a phloem-feeding insect, the pea aphid *Acyrtosiphon pisum* // *J. of Insect Physiology.* 2000. Vol. 46, № 3. P. 335–341.
15. Powell G., Hardie J. Xylem ingestion by winged aphids // *Entomol. Experiment. et Appl.* 2002. Vol. 104, № 1. P. 103–108.
16. Pompon J., Quiring D., Giordanengo P., Pelletier Y. Role of xylem consumption on osmoregulation in *Macrosiphum euphorbiae* (Thomas) // *J. of Insect Physiology.* 2010. Vol. 56, № 6. P. 610–615.
17. Gündüz E. A., Douglas A. E. Symbiotic bacteria enable insect to utilise a nutritionally-inadequate diet // *Proc. R. Soc.* 2009. Vol. 276. P. 987–991.
18. Pinto-Tomas A., Anderson M. A., Suen G., Stevenson D. M., Chu F. S. T., Wallace Cleland W., Weimer P. J., Currie C. R. Symbiotic Nitrogen Fixation in the Fungus Gardens of Leaf-Cutter Ants // *Science.* 2009. Vol. 326. P. 1120–1123.
19. Reid N. M., Lloyd-Jones G. Symbiotic nitrogen fixation in the New Zealand dampwood termite (*Stolotermes ruficeps*) // *New Zealand J. of Ecology.* 2009. Vol. 33. P. 90–95.
20. Hazell S. P., Neve B. P., Groutides C., Douglas A. E., Blackburn T. M., Bale J. S. Hyperthermic aphids : Insights into behaviour and mortality // *J. of Insect Physiology.* 2010. Vol. 56. P. 123–131.
21. Capinera J. L. *Encyclopedia of Entomology.* Dordrecht : Springer Science, 2008. 4346 p.