


Симбиотические бактерии *Wolbachia*, *Spiroplasma* и *Rickettsia* среди тлей (Aphidoidea)

Д.А. Романов^{1, 2}, И.А. Захаров¹, Е.В. Шайкевич^{1, 3} 

¹ Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Москва, Россия

² Московский государственный областной университет, Мытищи, Московская область, Россия

³ Институт медицинской паразитологии, тропических и трансмиссивных заболеваний им. Е.И. Марциновского Первого Московского государственного медицинского университета им. И.М. Сеченова (Сеченовский университет) Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

 e-mail: elenashaikevich@mail.ru

Аннотация. Тли – разнообразное семейство вредителей сельскохозяйственных культур. Тли сформировали сложную взаимосвязь с внутриклеточными бактериями, известными как эндосимбионты, которые оказывают как положительное, так и отрицательное влияние на хозяина, что может иметь практическое значение. В разных регионах мира состав факультативных симбионтов в популяциях тлей варьирует. Задачей работы было установить распространение и генетическое разнообразие симбионтов *Wolbachia*, *Spiroplasma* и *Rickettsia* в тлях, собранных в 2018–2019 гг. в Москве и Подмосковье. Для этого 578 тлей из 32 мест сбора тестировали методом ПЦР, используя специфические праймеры для мтДНК тлей, *Wolbachia*, *Spiroplasma* и *Rickettsia*. Методом молекулярно-генетического анализа определено не менее 21 вида тлей из 14 родов и четырех семейств. Одиннадцать видов оказались инфицированы эндосимбионтами, а именно: у шести видов обнаружены *Rickettsia*, у двух видов – *Wolbachia*, у одного – *Spiroplasma*. Впервые выявлено заражение бактерией *Rickettsia* у *Impatiens asiaticum*, *Myzus cerasi*, *Hyalopterus pruni*, *Eucallipterus tiliae*, *Chaitophorus tremulae* и бактерией *Wolbachia* у *Aphis pomi* и *C. tremulae*. У половины особей гороховой тли *Acyrtosiphon pisum* установлено двойное заражение *Rickettsia* и *Spiroplasma*. Впервые выявлены риккетсии у шести видов тлей, которые генетически отличаются от известных ранее. Впервые обнаружено заражение яблонной тли *A. pomi* двумя штаммами *Wolbachia*, причем один из штаммов относится к супергруппе В и генетически близок к *Wolbachia* из осиновой тли *C. tremulae*, а второй штамм относится к супергруппе М, недавно описанной у видов тлей. *Spiroplasma*, найденная нами у *A. pisum*, генетически близка *Spiroplasma*, вызывающей андроцид у тлей, божьих коровок и молей, и кластеризуется с *S. ixodetis*. Разнообразие ДНК симбионтов убедительно свидетельствует о том, что как материнское наследование, так и горизонтальный перенос являются путями распространения факультативных бактерий у тлей. Ключевые слова: тля; эндосимбионты; ПЦР; вредители растений; мутуализм.

Для цитирования: Романов Д.А., Захаров И.А., Шайкевич Е.В. Симбиотические бактерии *Wolbachia*, *Spiroplasma* и *Rickettsia* среди тлей (Aphidoidea). Вавиловский журнал генетики и селекции. 2020;24(6):673-682. DOI 10.18699/VJ20.661


Wolbachia, *Spiroplasma*, and *Rickettsia* symbiotic bacteria in aphids (Aphidoidea)

Д.А. Романов^{1, 2}, И.А. Захаров¹, Е.В. Шайкевич^{1, 3} 

¹ Vavilov Institute of General Genetics of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

² Moscow Region State University, Mytishi, Moscow region, Russia

³ Institute of Medical Parasitology and Tropical Medicine named after E. Martinsonskii, Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia

 e-mail: elenashaikevich@mail.ru

Abstract. Aphids are a diverse family of crop pests. Aphids formed a complex relationship with intracellular bacteria. Depending on the region of study, the species composition of both aphids and their facultative endosymbionts varies. The aim of the work was to determine the occurrence and genetic diversity of *Wolbachia*, *Spiroplasma* and *Rickettsia* symbionts in aphids collected in 2018–2019 in Moscow. For these purposes, 578 aphids from 32 collection sites were tested by PCR using specific primers. At least 21 species of aphids from 14 genera and four families were identified by barcoding method, of which 11 species were infected with endosymbionts. *Rickettsia* was found in six species, *Wolbachia* in two species, *Spiroplasma* in one species. The presence of *Rickettsia* in *Impatiens asiaticum*, *Myzus cerasi*, *Hyalopterus pruni*, *Eucallipterus tiliae*, *Chaitophorus tremulae* and *Wolbachia* in *Aphis pomi* and *C. tremulae* has been described for the first time. A double infection with *Rickettsia* and *Spiroplasma* was detected in a half of pea aphid (*Acyrtosiphon pisum*) individuals. For the first time was found that six species of aphids are infected with *Rickettsia* that are genetically different from previously known. It was first discovered that *A. pomi* is infected with two *Wolbachia* strains, one of which belongs to supergroup B and is genetically close to *Wolbachia* from *C. tremulae*. The second *Wolbachia* strain from *A. pomi* belongs to the supergroup M, recently described in aphid species. *Spiroplasma*, which we

observed in *A. pisum*, is genetically close to male killing *Spiroplasma* from aphids, ladybirds and moths. Both maternal inheritance and horizontal transmission are the pathways for the distribution of facultative endosymbiotic bacteria in aphids.

Key words: aphids; endosymbionts; PCR; plant pests; mutualism.

For citation: Romanov D.A., Zakharov I.A., Shaikovich E.V. *Wolbachia*, *Spiroplasma*, and *Rickettsia* symbiotic bacteria in aphids (Aphidoidea). *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2020;24(6):673-682. DOI 10.18699/VJ20.661

Введение

Тли (Hemiptera: Aphidoidea) – надсемейство насекомых из отряда полужесткокрылых, включающее около 10 семейств или подсемейств и 5000 видов. Тли распространены повсеместно, вредят растениям, питаются их соком, и являются переносчиками не менее 30 % видов вирусов растений (Augustinos et al., 2011). Для тлей характерна сложная взаимосвязь с внутриклеточными бактериями, известными как эндосимбионты. Облигатный мутуалистический симбиоз тлей с *Buchnera aphidicola* обеспечивает насекомое-хозяина незаменимыми аминокислотами, отсутствующими в растительных соках (Douglas, 1998). Кроме того, у тлей известны девять видов факультативных симбионтов (Guo et al., 2017), которые сосуществуют с *Buchnera* и оказывают как положительное, так и отрицательное влияние на хозяина.

В зависимости от вида факультативные внутриклеточные симбиотические бактерии могут повышать устойчивость тлей к тепловому шоку, к паразитоидным осам, грибковым инфекциям, участвовать в выработке необходимых для хозяина питательных веществ совместно с облигатным симбионтом, а также способствовать взаимодействию тлей с растением, на котором те питаются (Guo et al., 2017). В то же время было показано, что бактерии рода *Rickettsia* негативно влияют на приспособленность гороховой тли *Acyrtosiphon pisum* и подавляют деятельность *Buchnera aphidicola* (Sakurai et al., 2005). Бактерии рода *Spiroplasma* уменьшали продолжительность жизни у *A. pisum* и размножение тлей (Simon et al., 2007, 2011), хотя и обладали (слабым) защитным эффектом против осы-паразитоида *Aphidius ervi* (Mathé-Hubert et al., 2019). Роль *Wolbachia* в жизнедеятельности тлей до конца не ясна (De Clerck et al., 2015; Manzano-Marín, 2019). Однако у азиатских цитрусовых псиллид *Diaphorina citri* эндосимбионт *Wolbachia* репрессирует холиновый промотор альфапротеобактерии “*Candidatus Liberibacter asiaticus*”, вызывающей заболевание цитрусовых, что приводит к гибели бактерий и тем самым предотвращает распространение заболевания (Jain et al., 2017).

В настоящей статье изучаются факультативные эндосимбионты тлей *Wolbachia*, *Spiroplasma* и *Rickettsia*. *Wolbachia* – наиболее распространенный вид симбиотических бактерий среди насекомых, и тли не являются исключением. Зараженность *Wolbachia* обнаружена у 82 видов тлей (Zytynska, Weisser, 2016). У *A. pisum* встречаются два вида симбионтов – *Rickettsia* (Sakurai et al., 2005) и *Spiroplasma* (Fukatsu et al., 2001). Оба вида, *Spiroplasma* и *Rickettsia*, найдены также у тли коровьего гороха (вины китайской) *Aphis craccivora* (Brady et al., 2014) и у свекловичной (или бобовой) тли *Aphis fabae* (Zytynska et al., 2016). *Spiroplasma* обнаружена у тропических тлей –

цитрусовой *Aphis citricidus* и полифага *Aphis aurantii* (Guidolin, Cònsoli, 2018). *Rickettsia* найдена у тли ежевики *Amphorophora rubi* (Haynes et al., 2003) и бахчевой (или хлопковой) тли *Aphis gossypii* (Jones et al., 2011). В разных регионах мира состав симбионтов в популяциях тлей варьирует (Augustinos et al., 2011; Zytynska, Weisser, 2016; Guo et al., 2017; Guidolin, Cònsoli, 2018). В России, в Саратовской области среди факультативных симбионтов тлей бактерии *Wolbachia*, *Spiroplasma* и *Rickettsia* не были выявлены (Мальшина и др., 2014).

Исследование зараженности тлей симбионтами имеет практическое значение, так как позволяет приблизиться к созданию новых стратегий борьбы, блокирующих передачу патогенов растений (Heck, 2018). В зависимости от типа симбионта информация о зараженности может использоваться для вылечивания от симбионта или для трансинфекции определенным штаммом бактерии с целью уменьшения способности переносчика к передаче патогенов.

Задачей работы было установить распространение и генетическое разнообразие симбионтов *Wolbachia*, *Spiroplasma* и *Rickettsia* в выборках тлей в г. Москве, а также в городах Звенигороде и Люберцах Московской области. Для этого 578 тлей из 32 мест сбора тестировали методом ПЦР, используя специфические праймеры для *Wolbachia*, *Spiroplasma* и *Rickettsia*. Систематическое положение хозяев-тлей и их симбионтов установили, определив нуклеотидные последовательности генов тлей и бактерий.

Материалы и методы

Сбор тлей проводили в июле–сентябре 2018 г. и в мае 2019 г. в Москве, Звенигороде и Люберцах (табл. 1). Были собраны 32 выборки тлей на 17 видах растений. Собранные имаго тлей фиксировались в 96 % этаноле.

Выделение тотальной ДНК из индивидуальных особей осуществляли методом фенол-хлороформной экстракции (Sambrook et al., 1989). Реакции амплификации проводили в объеме 25 мкл с использованием универсального набора Encyclo Plus PCR kit («Евроген», Москва) в соответствии с протоколом фирмы-производителя. Все реакции выполнялись на термоциклере MiniAmp Plus (Applied Biosystems). Идентификацию видов тлей выполняли методом ПЦР с использованием универсальных праймеров LCO1490 и HCO2198, комплементарных 5'-концу гена цитохромоксидазы I (*COI*) мтДНК, как описано ранее (Folmer et al., 1994).

При выявлении симбионтов использовали специфические праймеры: RicF141 и RicR548 для гена *gltA* *Rickettsia* (Goryacheva et al., 2017), *spi_f1* и *spi_r3* для 16S рРНК *Spiroplasma* (Sanada-Morimura et al., 2013), *ftsZ-F1* и *ftsZ-R1* для гена *ftsZ* *Wolbachia* (Baldo et al., 2006).

Таблица 1. Виды тлей и растений, дата и место сбора

Вид тли	Место сбора	Время сбора	Вид растения
<i>Acyrtosiphon caraganae</i> , тля акациевая большая	Люберцы, Октябрьский пр-т, 55°41'37" с. ш., 37°51'55" в. д.	Май 2019	<i>Caragana arborescens</i> , карагана древовидная
<i>Acyrtosiphon pisum</i> , тля гороховая	Звенигород, биостанция МГУ, 55°41'59" с. ш., 36°43'19" в. д.	Июль 2018	<i>Pisum sativum</i> , горох посевной
<i>Anoesia</i> sp., тля свидинно-злаковая	(1) Москва, Нескучный сад, 55°42'46" с. ш., 37°35'02" в. д.	Сентябрь 2019	<i>Cornus alba</i> , дерен белый
	(2) Москва, Нескучный сад, 55°42'51" с. ш., 37°35'14" в. д.		<i>Cornus sanguinea</i> , дерен кроваво-красный
<i>Anuraphis subterranea</i> , тля грушево-зонтичная бурая	Москва, ул. Генерала Кузнецова, 55°41'22" с. ш., 37°51'34" в. д.	Май 2019	<i>Pyrus calleryana</i> , груша декоративная
<i>Aphis fabae</i> , тля свекловичная	Москва, ул. Генерала Кузнецова, 55°41'15" с. ш., 37°51'27" в. д.	Май 2019	<i>Philadelphus</i> sp., чубушник
<i>Aphis pomi</i> , тля яблонная зеленая	(1) Москва, ул. Академика Хохлова, 55°42'17" с. ш., 37°31'30" в. д.	Май 2019	<i>Malus domestica</i> , яблоня домашняя
	(2) Москва, ул. Солнечная, 55°35'25" с. ш., 37°22'03" в. д.		<i>Cotoneaster</i> sp., кизильник
	(3) Москва, ул. Ферсмана, 55°41'37" с. ш., 37°34'15" в. д.		
<i>Chaitophorus tremulae</i> , тля осиновая	Москва, ул. Солнечная, 55°35'13" с. ш., 37°22'20" в. д.	Май 2019	<i>Populus tremula</i> , осина обыкновенная
<i>Corylobium avellanae</i> , тля лещинная	Москва, ул. Губкина, 55°41'49" с. ш., 37°33'54" в. д.	Май 2019	<i>Corylus avellana</i> , лещина обыкновенная
<i>Dysaphis</i> sp.	Москва, ул. Академика Хохлова, 55°42'15" с. ш., 37°31'32" в. д.	Май 2019	<i>Malus domestica</i> , яблоня домашняя
<i>Dysaphis affinis</i> , тля яблонево-полосатая	Москва, ул. Генерала Кузнецова, 55°41'22" с. ш., 37°51'34" в. д.	Май 2019	<i>Pyrus calleryana</i> , груша декоративная
<i>Dysaphis devecta</i> , тля яблонево-серая	Москва, ул. Академика Хохлова, 55°42'19" с. ш., 37°31'26" в. д.	Май 2019	<i>Malus domestica</i> , яблоня домашняя
<i>Dysaphis plantaginea</i> , тля яблонно-подорожниковая	Москва, ул. Генерала Кузнецова, 55°41'18" с. ш., 37°51'24" в. д.	Май 2019	<i>Malus domestica</i> , яблоня домашняя
<i>Eucallipterus tiliae</i> , тля липовая	Москва, ул. Губкина, 55°41'45" с. ш., 37°33'52" в. д.	Май 2019	<i>Tilia</i> sp., липа
<i>Hyalopterus pruni</i> , тля тростниковая	Москва, ул. Мытная, 55°42'46" с. ш., 37°37'16" в. д.	Май 2019	<i>Prunus cerasus</i> , вишня обыкновенная
<i>Huperomyzus lactucae</i> , тля салатная	Люберцы, Октябрьский пр-т, 55°41'38" с. ш., 37°51'55" в. д.	Май 2019	<i>Ribes nigrum</i> , смородина черная
<i>Impatiens asiaticum</i> , тля бальзаминная азиатская	(1) Москва, Царицыно, 55°36'35" с. ш., 37°40'43" в. д.	Сентябрь 2018	<i>Impatiens parviflora</i> , недотрога мелкоцветковая
	(2) Москва, Коломенское, 55°40'20" с. ш., 37°41'02" в. д.		
	(3) Москва, Коломенское, 55°39'51" с. ш., 37°40'05" в. д.		
	(4) Москва, Нескучный сад, 55°42'48" с. ш., 37°35'11" в. д.		
	(5) Москва, Леоновская роща, 55°50'30" с. ш., 37°38'04" в. д.		
<i>Macrosiphum rosae</i> , тля розанная зеленая	Москва, ул. Шухова, 55°43'00" с. ш., 37°36'54" в. д.	Май 2019	<i>Rosa</i> sp., шиповник
<i>Myzus cerasi</i> , тля вишневая	(1) Москва, ул. Губкина, 55°41'40" с. ш., 37°34'00" в. д.	Май 2019	<i>Prunus cerasus</i> , вишня обыкновенная
	(2) Москва, ул. Мытная, 55°42'45" с. ш., 37°37'17" в. д.		
<i>Rhopalosiphum loniceriae</i> , тля злаково-жимолостная	Москва, ул. Генерала Кузнецова, 55°41'25" с. ш., 37°51'36" в. д.	Май 2019	<i>Lonicera tatarica</i> , жимолость татарская
<i>Rhopalosiphum padi</i> , тля черемуховая обыкновенная	(1) Москва, ИБР, теплица, 55°42'03" с. ш., 37°34'35" в. д.	Сентябрь 2018	<i>Triticum</i> sp., пшеница
	(2) Москва, ул. Саранская, 55°41'31" с. ш., 37°51'25" в. д.	Май 2019	<i>Prunus padis</i> , черемуха обыкновенная
	(3) Москва, ул. Ферсмана, 55°41'36" с. ш., 37°34'12" в. д.		
<i>Schizaphis graminum</i> , тля злаковая обыкновенная	(1) Москва, ИБР, теплица, 55°42'03" с. ш., 37°34'35" в. д.	Сентябрь 2018	<i>Triticum</i> sp., пшеница
	(2) Москва, ИОГен, теплица, 55°41'47" с. ш., 37°33'53" в. д.	Май 2019	

Условия амплификации: начальная денатурация – 4 мин 30 с при 94 °С, после которой следовало 36 циклов: денатурация – 30 с при 94 °С, отжиг – 30 с при 59 °С (для *spi_f1* и *spi_r3* – при 53 °С; для *ftsZ* – при 56 °С) и элонгация – 40 с (для *spi_f1* и *spi_r3* – 1 мин) при 72 °С. ПЦР завершалась заключительной элонгацией в течение 5 мин при 72 °С.

Результаты ПЦР визуализировали методом электрофореза в 1.5 % агарозном геле. Элюция фрагментов из геля проводилась с использованием набора для выделения ДНК из агарозных гелей Cleanup Mini («Евроген», Москва) в соответствии с инструкциями фирмы-производителя. Секвенирование очищенных ПЦР-продуктов выполнялось в компании «Евроген». Вновь полученные последовательности гена *COI* зарегистрированы в GenBank под номерами MT302332–MT302357, *gltA Rickettsia* – MT302358–MT302364, *ftsZ Wolbachia* – MT302365–MT302368, 16S *Spiroplasma* – MT302369.

Хроматограммы сиквенсов анализировали с помощью комплекта программ DNASTAR Lasergene 6 (Clewley, 1995; Burland, 2000). Для сравнения полученных нами сиквенсов с уже известными использовали базы данных Barcode of Life Database (Bold) (<http://www.barcodinglife.com/>) и GenBank (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). При построении дендрограмм применяли метод присоединения соседей, эволюционную модель Кимуры, бутстреп-поддержку 1000 реплик в программе MEGA 6.06 (Tamura et al., 2013). Для последовательностей ДНК на дендрограммах справа от названия изолята приведены

регистрационные номера GenBank и PubMLST для *Wolbachia*. Расчет дивергенции между нуклеотидными последовательностями гена проводили, основываясь на значениях *p*-дистанции (число нуклеотидных различий на сайт), с помощью программы MEGA 6.06 (Tamura et al., 2013).

Результаты

Разнообразие видов тлей

Для идентификации видов тлей был применен метод штрихкодирования (Barcoding). Используя нуклеотидные последовательности фрагментов митохондриального гена *COI*, в 32 выборках мы идентифицировали не менее 21 вида тлей; 19 из них удалось определить до вида, а тлей из двух выборок – до рода: *Dysaphis* sp. с яблони (*Malus domestica*) и *Anoecia* sp. с дерена белого (*Cornus alba*) и дерена кроваво-красного (*C. sanguinea*). Наибольшее сходство обнаружено с видами тлей *Dysaphis apiifolia* (97 %) и *Anoecia fulviabdominalis* (96 %). Собранные тли относятся к четырем семействам: Anoeciidae, Callaphididae, Chaitophoridae и Aphididae (рис. 1). Значения эволюционной дивергенции между родами тлей составляют 6–16 %, между видами рода *Dysaphis* – 0.8–6.6 %, между видами рода *Aphis* – 6.3 %. По два гаплотипа мтДНК обнаружены у трех видов: *Aphis pomi*, *Chaitophorus tremulae*, *A. pisum* (см. рис. 1). Различия между гаплотипами по гену *COI* составляют у *A. pomi* 0.2 %, у *C. tremulae* – 0.6 % и *A. pisum* – 0.16 %.

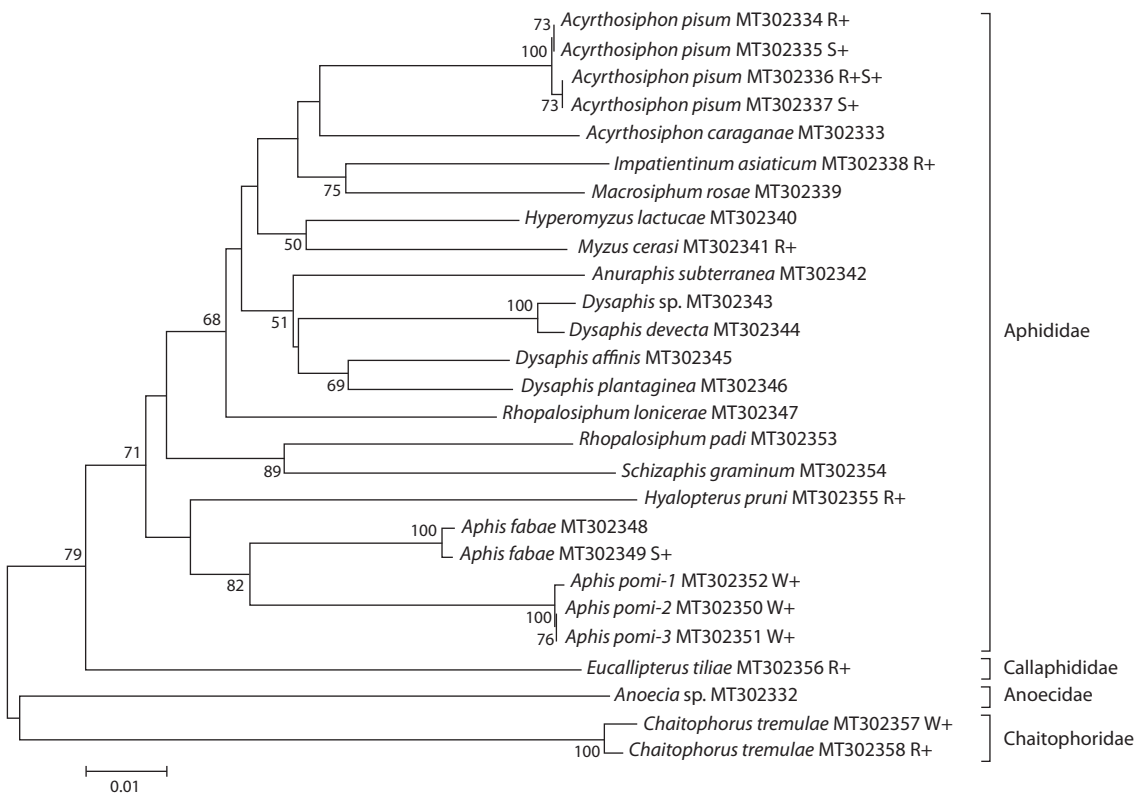


Рис. 1. Филогенетическая реконструкция видового разнообразия тлей по данным анализа нуклеотидных последовательностей митохондриального гена *COI* длиной 630 п. н.

Зараженные *Wolbachia*, *Rickettsia*, *Spiroplasma* особи обозначены как W+, R+, S+ соответственно.

Таблица 2. Частота зараженности тлей симбионтами

Вид тли	Кол-во проверенных особей	Вид симбионта и число зараженных		
		<i>Spiroplasma</i>	<i>Rickettsia</i>	<i>Wolbachia</i>
<i>Acyrtosiphon caraganae</i>	20	0	0	0
<i>Acyrtosiphon pisum</i>	28	24	17	0
<i>Anoecia</i> sp. (1)	17	0	0	0
<i>Anoecia</i> sp. (2)	12	0	0	0
<i>Anuraphis subterranea</i>	11	0	0	0
<i>Aphis fabae</i>	40	0	0	0
<i>Aphis pomi</i> (1)	11	0	0	11
<i>Aphis pomi</i> (2)	36	0	0	36
<i>Aphis pomi</i> (3)	26	0	0	26
<i>Chaitophorus tremulae</i>	9	0	3	2
<i>Corylobium avellanae</i>	10	0	0	0
<i>Dysaphis</i> sp.	9	0	0	0
<i>Dysaphis affinis</i>	9	0	0	0
<i>Dysaphis devectora</i>	10	0	0	0
<i>Dysaphis plantaginea</i>	30	0	0	0
<i>Eucallipterus tiliae</i>	16	0	5	0
<i>Hyalopterus pruni</i>	10	0	10	0
<i>Hyperomyzus lactucae</i>	18	0	0	0
<i>Impatientinum asiaticum</i> (1)	18	0	11	0
<i>Impatientinum asiaticum</i> (2)	18	0	8	0
<i>Impatientinum asiaticum</i> (3)	18	0	14	0
<i>Impatientinum asiaticum</i> (4)	18	0	8	0
<i>Impatientinum asiaticum</i> (5)	18	0	7	0
<i>Macrosiphum rosae</i>	27	0	0	0
<i>Myzus cerasi</i> (1)	8	0	1	0
<i>Myzus cerasi</i> (2)	23	0	0	0
<i>Rhopalosiphum loniceriae</i>	12	0	0	0
<i>Rhopalosiphum padi</i> (1)	30	0	0	0
<i>Rhopalosiphum padi</i> (2)	12	0	0	0
<i>Rhopalosiphum padi</i> (3)	6	0	0	0
<i>Schizaphis graminum</i> (1)	18	0	0	0
<i>Schizaphis graminum</i> (2)	30	0	0	0
Всего (%)	578 (100 %)	24 (4 %)	84 (14 %)	75 (13 %)

Яблонная тля (*A. pomi*), черемуховая (*Rhopalosiphum padi*), вишневая (*Myzus cerasi*) и бальзаминная (*Impatientinum asiaticum*) обнаружены в двух и более местах сбора (см. табл. 1). По два вида тлей найдены на одном виде растений: *Hyalopterus pruni* и *M. cerasi* – на вишнях, *A. pomi* и *Dysaphis devectora* – на яблонях, *Anuraphis subterranea* и *Dysaphis affinis* – на груше, причем последние два вида тлей сосуществовали на листьях одного и того же дерева (см. табл. 1). Один вид тли на разных видах растений встретился нам дважды: *R. padi* на черемухе и пшенице и *A. pomi* на яблоне и кизильнике.

Зараженность симбиотическими бактериями

Проанализировав наличие *Wolbachia*, *Spiroplasma* и *Rickettsia* у 578 особей 21 вида тлей, мы обнаружили заражение у *A. pisum* (*Spiroplasma* и *Rickettsia*), *I. asiaticum*,

M. cerasi, *H. pruni*, *Eucallipterus tiliae* (*Rickettsia*), *A. pomi* (*Wolbachia*) и *Chaitophorus tremulae* (*Rickettsia* и *Wolbachia*) (табл. 2). У *C. tremulae* особи, зараженные *Rickettsia* и *Wolbachia*, обладают различающимися гаплотипами мтДНК (см. рис. 1).

Rickettsia обнаружены у шести видов, суммарно у 84 особей тлей, *Wolbachia* – у двух видов и 75 особей, *Spiroplasma* – у 24 особей одного вида (см. табл. 2). Как правило, отдельные особи тлей заражены симбиотическими бактериями только одного из трех видов. Однако у *A. pisum* обнаружен факт двойного заражения *Rickettsia* и *Spiroplasma* у 13 из 28 индивидуальных особей. Все имаго *A. pisum* (100 %) были заражены эндосимбионтами одного или двух видов. Наличие *Rickettsia* у *I. asiaticum*, *M. cerasi*, *H. pruni*, *E. tiliae*, *C. tremulae* и *Wolbachia* у *A. pomi* и *C. tremulae* описано впервые.

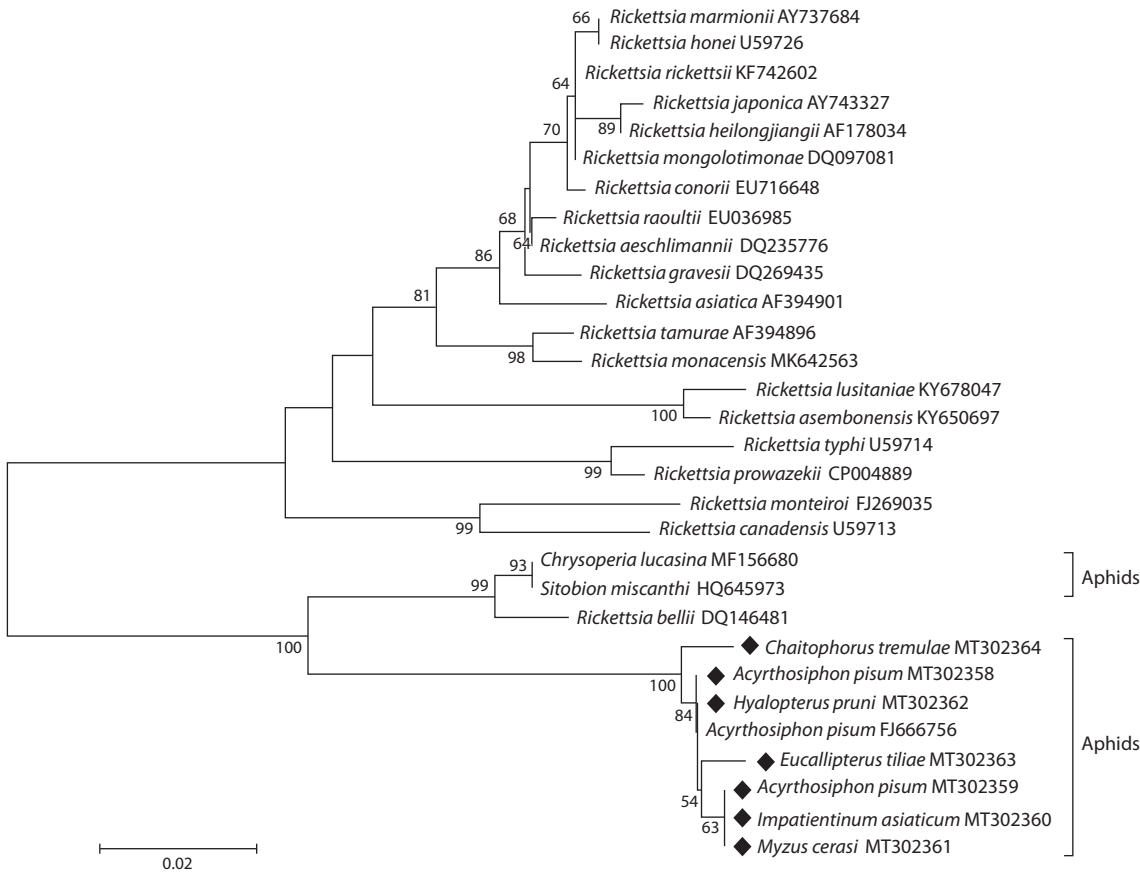


Рис. 2. Филогенетическая реконструкция разнообразия *Rickettsia* по данным анализа нуклеотидных последовательностей гена *gltA* длиной 343 п. н.

Бактерии тлей обозначены по виду хозяина. Бактериальные изоляты, последовательности которых получены в данной работе, выделены ромбами.

Бактерии рода *Rickettsia*. *Rickettsia* тлей кластеризуются с бактериями группы *R. bellii* (рис. 2). У *E. tiliae* и *C. tremulae* аллели гена *gltA* видоспецифичны. У *Rickettsia* из *A. pisum* обнаружено две аллели гена, *gltA*¹ и *gltA*² (номера GenBank MT302358 и MT302359), различающиеся одной нуклеотидной заменой. Аллель *gltA*¹ встретила у одной особи, тогда как аллель *gltA*² – у семи особей *A. pisum*. Аллель *gltA*¹ выявлена также у *Rickettsia* из *H. pruni*, а аллель *gltA*² – у *Rickettsia* из *I. asiaticum* и *M. cerasi*. Аллель *gltA*¹ идентична ДНК *Rickettsia* из *A. pisum* штамма PAR (США), зарегистрированной в Генбанке под номером FJ666756 (см. рис. 2). Аллель *gltA*² выявлена впервые. Значительно различаются полученные нами последовательности ДНК *Rickettsia* от ДНК бактерии из тли *Sitobion miscanthi* (HQ645973), которая генетически близка к *R. bellii* (см. рис. 2). Значение эволюционной дивергенции между группой *R. bellii* и группой *Rickettsia* из данной работы составляет 8.2 %, что намного превышает значения дивергенции между такими видами, как, например, *R. typhi* и *R. prowazekii* (2 %).

Бактерии рода *Wolbachia*. В филогенетической классификации *Wolbachia* выделены 16 супергрупп (Glowaska et al., 2016). *Wolbachia* из *Aphis pomi* 1 (MT302366) и 3 (MT302367) кластеризуется с бактериями супергруппы М, тогда как *Wolbachia* из *Chaitophorus tremulae*

(MT302365) и *A. pomi* 2 (MT302368) – с бактерией из супергруппы В (рис. 3). Различия по ДНК гена *ftsZ* *Wolbachia* из *A. pomi* 2 (MT302368) и 1 (MT302366) составляют 14.3 % (67 из 466 п. н.) В то же время аллель гена *ftsZ* *Wolbachia* из *A. pomi* 2 (MT302368) отличается только тремя заменами (0.6 %, 3 из 469 п. н.) от ДНК *Wolbachia* из осинового тли *Chaitophorus tremulae* (MT302365).

Выборка *A. pomi* с *Wolbachia* группы В собрана на кизильнике, выборки *A. pomi* с *Wolbachia* группы М – на кизильнике и яблоне (см. табл. 1). Расстояние между точками сбора *A. pomi* на растениях одного вида, зараженных разными штаммами *Wolbachia*, составляет более 20 км, а расстояние между точками сбора *A. pomi* на растениях разного вида, но зараженных одинаковым штаммом *Wolbachia*, не превышает 4 км (см. табл. 1).

Бактерии рода *Spiroplasma*. Обнаруженная нами *Spiroplasma* из *A. pisum* кластеризуется с бактериями, найденными у *A. pisum* в Японии (AB048263), Великобритании (JX943566, JX943567) и *A. craccivora* из США (KF362032) (рис. 4). Изменчивость генов 16S рРНК *Spiroplasma* у тлей *A. pisum* из географически удаленных мест составляет 0.3–0.6 % (5–8 нуклеотидных замен на 974 п. н.). Все они входят в кладу *Spiroplasma ixodetis*. В эту же кладу входят симбионты других насекомых, например божьих коровок *Anisosticta novemdecimpunctata* (AM087471) и

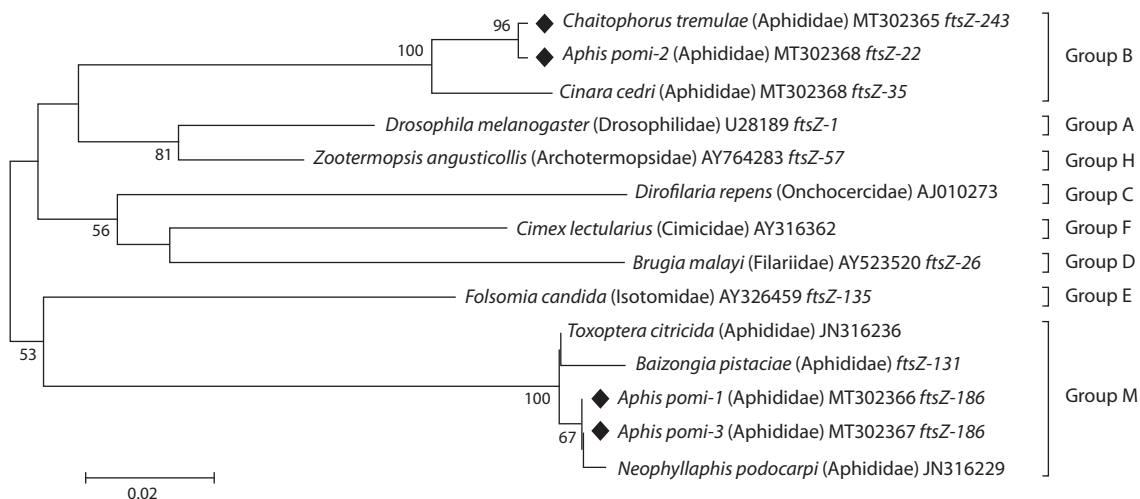


Рис. 3. Филогенетическая реконструкция разнообразия *Wolbachia* по данным анализа нуклеотидных последовательностей гена *ftsZ* длиной 466 п. н.

Супергруппы *Wolbachia* приведены справа. Бактерии обозначены по виду хозяина, в скобках указано семейство хозяина. Бактериальные изоляты, последовательности которых получены в данной работе, выделены ромбами.

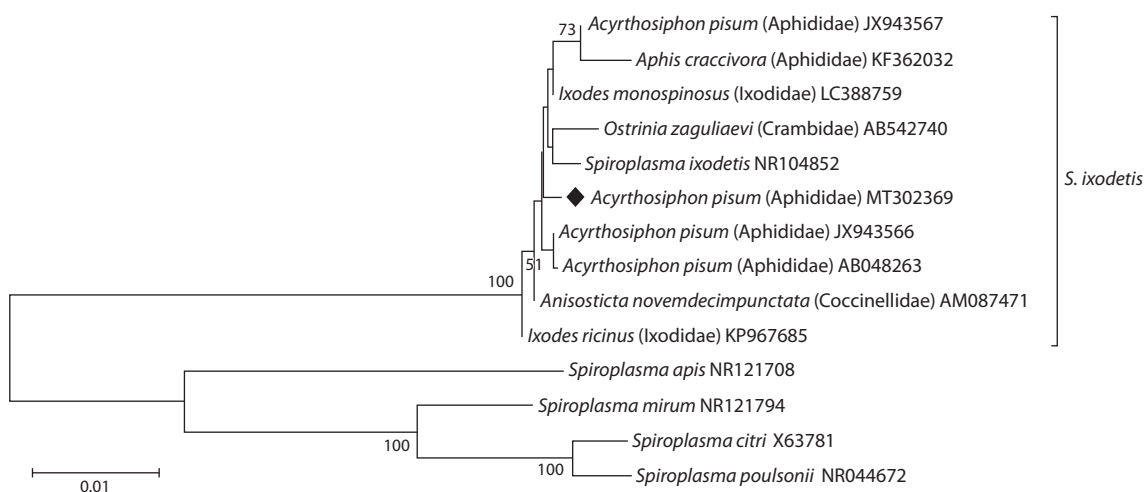


Рис. 4. Филогенетическая реконструкция видового разнообразия *Spiroplasma* по данным анализа нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК длиной 974 п. н.

Бактерии насекомых обозначены по виду хозяина, в скобках указано семейство хозяина. Бактериальный изолят, последовательность которого получена в данной работе, выделен ромбом.

мотыльков *Ostrinia zaguliaevi* (AB542740). Внутри этой клады разнообразие нуклеотидов не превышает 0.6 %. Между кладами рода *Spiroplasma* разнообразие нуклеотидов достигает 10–16 %.

Обсуждение

В данной работе нам удалось показать, что изученные 32 выборки тлей представлены не менее чем 21 видом. Большинство исследованных видов тлей (18 из 21) относится к семейству Aphididae, и присутствует по одному виду из семейств Anoeciidae, Callaphididae и Chaitophoridae. Два вида не приурочены к растению-хозяину, а 19 видов тлей встретились нам только на одном виде растений.

Впервые обнаружено заражение *Rickettsia* у *I. asiaticum*, *M. cerasi*, *H. pruni*, *E. tiliae*, *C. tremulae* и *Wolbachia*

у *A. pomi* и *C. tremulae*. В отличие от других исследований (Zytynska, Weisser, 2016), в наших сборах в Москве виды тлей в основном заражены *Rickettsia*, а не *Wolbachia*. У осинового тли *C. tremulae* особи, зараженные бактериями *Rickettsia* и *Wolbachia*, имеют различающиеся гаплотипы мтДНК. Сохраняется ли совместная передача цитоплазматических компонентов у тлей этого вида, предстоит выяснить на большем количестве образцов. У половины особей гороховой тли *A. pisum* выявлено двойное заражение *Rickettsia* и *Spiroplasma*. Многие исследователи уже отмечали присутствие *Rickettsia* и *Spiroplasma* среди факультативных симбионтов *A. pisum* в Европе (Nyabuga et al., 2010; Ferrari et al., 2012; Gauthier et al., 2015), США (Russell et al., 2013; Smith et al., 2015), Японии (Tsuchida et al., 2002). Зараженность 28 особей *A. pisum* в исследуемой

выборке из г. Звенигорода составила 61 % (*Rickettsia*) и 86 % (*Spiroplasma*), что в несколько раз превышает опубликованные ранее показатели: 8 и 3 % в 119 изосамочных линиях из 81 популяции в Японии (Tsuchida et al., 2002), 48 и 9 % среди 318 особей в США (Russell et al., 2013), 4 и 22 % в 30 линиях (Nyabuga et al., 2010), 23 и 27 % в выборках с восьми видов бобовых растений из Англии и Германии (Ferrari et al., 2012). Возможно, такая высокая зараженность бактериями существует непродолжительное время, поскольку и *Spiroplasma*, и *Rickettsia* снижают продолжительность жизни тлей и их плодовитость (Simon et al., 2007, 2011; Mathé-Hubert et al., 2019). Согласно нашим предыдущим наблюдениям, при длительном лабораторном культивировании *A. pisum* симбиотические бактерии *Spiroplasma* утрачивались.

Rickettsia тлей в наших сборах формируют отдельный кластер. Ранее было показано, что *Rickettsia* из *A. pisum* на основе сравнения четырех генов бактерии относится к группе *R. bellii* (Weinert et al., 2009). Необходимо исследование других генов бактерии у разных видов тлей, для того чтобы установить, являются ли они отдельным видом рода *Rickettsia*. Группа бактерий *R. bellii* представляют собой базальную группу риккетсий, которая сформировалась ранее *Rickettsia* группы патогенной пятнистой лихорадки и группы сыпного тифа (Stothard et al., 1994). Четыре генетически различающиеся аллели гена *gltA* *Rickettsia* обнаружены у изученных шести видов тлей, причем две из них встретились у *A. pisum*. Одна аллель (MT302359) встретилась нам у представителей трех родов тлей, другая (MT302358) – у двух родов, и оставшиеся два вида обладают уникальными аллельными вариантами симбионта. Это позволяет предположить, что заражение *Rickettsia* у разных видов тлей происходило независимым образом.

Spiroplasma, выделенная у *A. pisum* на основе анализа ДНК гена 16S рРНК, кластеризуется с бактериями, найденными ранее у *A. pisum* и *A. craccivora*. Было показано, что у *A. pisum* *Spiroplasma* вызывают смерть потомства мужского пола на ранних личиночных стадиях – так называемый андроцид, или male killing (Simon et al., 2011), и генетически они близки *Spiroplasma*, вызывающим андроцид у хищников тлей – божьих коровок (Tinsley, Majerus, 2006) и мотыльков (Tabata et al., 2011). Все эти бактерии относятся к группе *Spiroplasma ixodetis*. Бактерия *S. ixodetis* является эндосимбионтом, который описан у клещей, но широко распространен и среди других членистоногих. Филогенетические исследования показали, что штаммы *S. ixodetis* неоднократно подвергались горизонтальным переносам между клещами и другими членистоногими, включая тлю (Binetruy et al., 2019).

Мы впервые обнаружили зараженность *Wolbachia* у яблонной тли *A. pomi*. Этот симбионт встречается у 100 % особей *A. pomi* в наших сборах, тогда как ранее у тлей данного вида из Греции он не выявлялся (Augustinos et al., 2011). Яблонная тля *A. pomi* из трех мест сбора в Москве (см. 1–3 в табл. 1) инфицирована двумя штаммами *Wolbachia*, один из которых относится к супергруппе В, а другой – к супергруппе М (см. рис. 3). Супергруппа М недавно описана у видов тлей в Испании, Португалии, Греции, Израиле и Иране (Augustinos et al., 2011), Китае (Wang et al., 2014) и на Азорских островах (Moreira et al.,

2019). Во всех работах в исследованных сборах тлей преобладали *Wolbachia* супергруппы М. На основе данных о низкой генетической изменчивости *Wolbachia* супергруппы М предполагается ее недавнее появление и быстрое распространение по популяциям тлей (Wang et al., 2014).

Наши результаты позволяют предположить, что зараженность *A. pomi* определенным штаммом *Wolbachia* связана не с видом растения-хозяина тли, а с местом произрастания растений. Интересный факт обнаружения мало различающихся аллельных вариантов гена *ftsZ* *Wolbachia* у тлей разных видов (*A. pomi* и *C. tremulae*) может указывать на возможность обмена генами бактерии при горизонтальных переносах *Wolbachia* среди насекомых, например, через паразитов или через растения. В пользу этой гипотезы говорит находка близкородственных аллелей генов *Wolbachia* у других неродственных насекомых (Pinsky, Kosterin, 2017; Shaikovich et al., 2019). Разнообразие ДНК симбионтов убедительно свидетельствует о том, что как материнское наследование, так и горизонтальные переносы являются основными путями распространения факультативных бактерий у тлей.

Заключение

Понимание роли симбионтов тлей постепенно растет благодаря данным лабораторных исследований, однако информации о распространении симбионтов в популяциях тлей в природных экосистемах пока недостаточно. Наши результаты представляют собой первое сообщение о генетическом разнообразии бактериальных эндосимбионтов у видов тлей, которые ранее не подвергались изучению. В результате скрининга популяций тлей в г. Москве и Московской области впервые выявлено заражение шести видов тлей риккетсиями, генетически отличающимися от *R. bellii*, к которой принято относить симбионтов тлей (Weinert et al., 2009). Вопрос о выделении этих бактерий в новый вид можно будет решить, исследуя большее число аллелей *Rickettsia*. Впервые обнаружено заражение яблонной тли *A. pomi* двумя штаммами *Wolbachia*, причем один из штаммов относится к супергруппе В и генетически близок с *Wolbachia* из осинового тли, а второй штамм относится к супергруппе М. Вне зависимости от штамма, 100 % исследованных нами особей *A. pomi* заражены *Wolbachia*, и можно предположить существование отбора инфицированных особей за счет репродуктивных манипуляций, обнаруженных у *Spiroplasma* из *A. pisum* (Simon et al., 2011). Однако большинство поколений тлей бесполое, и если репродуктивные эффекты поддерживают зараженность симбионтами в естественных популяциях тлей, то такой репродуктивный фенотип должен быть очень полезным для насекомого-хозяина. Очевидным преимуществом андроцида является избегание инбридинга в популяции тлей (Simon et al., 2011). Достаточно ли этих преимуществ, чтобы компенсировать возможные издержки инфекции симбионтами во время бесполой фазы жизненного цикла, не ясно. По-видимому, положительное влияние, такое как предохранение устойчивости к естественным врагам (паразитоиды, патогенные грибы, тепловой стресс), служит ключевым фактором увеличения частоты факультативных эндосимбионтов *Wolbachia*, *Spiroplasma* и *Rickettsia* в популяции тлей.

Список литературы / References

- Малышина М.С., Петерсон А.М., Глинская Е.В. Эколого-физиологические аспекты формирования микробценозов тлей (Hemiptera: Aphididae), паразитирующих на древесных и кустарниковых растениях в Саратовской области. *Тр. Рус. энтомот. о-ва*. 2014;85(2):40-46.
[Malysheina M.S., Peterson A.M., Glinskaya E.V. Ecological and physiological aspects of the formation of microbial cenoses in aphids (Hemiptera: Aphididae) feeding on woody and shrubby plants in Saratov oblast. *Trudy Russkogo Entomologicheskogo Obshchestva = Proceedings of the Russian Entomological Society*. 2014;85(2):40-46. (in Russian)]
- Augustinos A.A., Santos-Garcia D., Dionyssopoulou E., Moreira M., Papapanagiotou A., Scarvelakis M., Doudoumis V., Ramos S., Aguiar A.F., Borges P.A.V., Khadem M., Latorre A., Tsiamis G., Bourtzis K. Detection and characterization of *Wolbachia* infections in natural populations of aphids: is the hidden diversity fully unraveled? *PLoS One*. 2011;6(12):e28695. DOI 10.1371/journal.pone.0028695.
- Baldo L., Dunning Hotopp J.C., Jolley K.A., Bordenstein S.R., Biber S.A., Choudhury R.R., Hayashi C., Maiden M.C., Tettelin H., Werren J.H. Multilocus sequence typing system for the endosymbiont *Wolbachia pipientis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2006;72(11):7098-7110. DOI 10.1128/AEM.00731-06.
- Binetruy F., Bailly X., Chevillon C., Martin O.Y., Bernasconi M.V., Duron O. Phylogenetics of the *Spiroplasma ixodetis* endosymbiont reveals past transfers between ticks and other arthropods. *Ticks Tick-Borne Dis.* 2019;10:575-584.
- Brady C.M., Asplen M.K., Desneux N., Heimpel G.E., Hopper K.R., Linnen C.R., Oliver K.M., Wulff J.A., White J.A. Worldwide populations of the aphid *Aphis craccivora* are infected with diverse facultative bacterial symbionts. *Microb. Ecol.* 2014;67:195-204. DOI 10.1007/s00248-013-0314-0.
- Burland T.G. DNASTAR's Lasergene sequence analysis software. *Methods Mol. Biol.* 2000;132:71-91.
- Clewley J.P. Macintosh sequence analysis software. DNASTAR's LaserGene. *Mol. Biotechnol.* 1995;3:221-224.
- De Clerck C., Fujiwara A., Joncour P., Léonard S., Félix M.L., Francis F., Jijakli M.H., Tsuchida T., Massart S. A metagenomic approach from aphid's hemolymph sheds light on the potential roles of co-existing endosymbionts. *Microbiome*. 2015;3:63. DOI 10.1186/s40168-015-0130-5.
- Douglas A. Nutritional interactions in insect-microbial symbioses: aphids and their symbiotic bacteria *Buchnera*. *Annu. Rev. Entomol.* 1998;43:17-37.
- Ferrari J., West J.A., Via S., Godfray H.C. Population genetic structure and secondary symbionts in host-associated populations of the pea aphid complex. *Evolution*. 2012;66(2):375-390. DOI 10.1111/j.1558-5646.2011.01436.x.
- Folmer O., Black M., Hoeh W., Lutz R., Vrijenhoek R. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome *c* oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 1994;3:294-299.
- Fukatsu T., Tsuchida T., Nikoh N., Koga R. *Spiroplasma* symbiont of the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum* (Insecta: Homoptera). *Appl. Environ. Microbiol.* 2001;67(3):1284-1291. DOI 10.1128/AEM.67.3.1284-1291.2001.
- Gauthier J.-P., Outreman Y., Miezuet L., Simon J.-C. Bacterial communities associated with host-adapted populations of pea aphids revealed by deep sequencing of 16S ribosomal DNA. *PLoS One*. 2015;10(3):e0120664. DOI 10.1371/journal.pone.0120664.
- Glowska E., Dragun-Damian A., Dabert M., Gerth M. New *Wolbachia* supergroups detected in quill mites (Acari: Syringophilidae). *Infect. Genet. Evol.* 2016;30:140-146.
- Goryacheva I., Blekhman A., Andrianov B., Zakharov I.A. Heritable bacterial endosymbionts in native and invasive populations of *Harmonia axyridis*. *Biol. Invasions*. 2017;19:493-502. DOI 10.1007/s10530-016-1298-8.
- Guidolin A.S., Cônsoli F.L. Diversity of the most commonly reported facultative symbionts in two closely-related aphids with different host ranges. *Neotrop. Entomol.* 2018;47(4):440-446. DOI 10.1007/s13744-017-0532-0.
- Guo J., Hatt S., He K., Chen J., Francis F., Wang Z. Nine facultative endosymbionts in aphids. A review. *J. Asia-Pac. Entomol.* 2017;20:794-801. DOI 10.1016/j.aspen.2017.03.025.
- Haynes S., Darby A.C., Daniell T.J., Webster G., Van Veen F.J., Godfray H.C., Prosser J.I., Douglas A.E. Diversity of bacteria associated with natural aphid populations. *Appl. Environ. Microbiol.* 2003;69(12):7216-7223. DOI 10.1128/aem.69.12.7216-7223.2003.
- Heck M. Insect transmission of plant pathogens: a systems biology perspective. *mSystems*. 2018;3(2):e00168-17. DOI 10.1128/mSystems.00168-17.
- Ilinsky Y., Kosterin O.E. Molecular diversity of *Wolbachia* in Lepidoptera: prevalent allelic content and high recombination of MLST genes. *Mol. Phylogenet. Evol.* 2017;109:164-179. DOI 10.1016/j.ympev.2016.12.034.
- Jain M., Fleites L.A., Gabriel D.W. A small *Wolbachia* protein directly represses phage lytic cycle genes in "Candidatus *Liberibacter asiaticus*" within psyllids. *mSphere*. 2017;2(3):e00171-17. DOI 10.1128/mSphereDirect.00171-17.
- Jones R.T., Bressan A., Greenwell A.M., Fierer N. Bacterial communities of two parthenogenetic aphid species cocolonizing two host plants across the Hawaiian Islands. *Appl. Environ. Microbiol.* 2011;77(23):8345-8349. DOI 10.1128/AEM.05974-11.
- Manzano-Marín A. No evidence for *Wolbachia* as a nutritional co-obligate endosymbiont in the aphid *Pentalonia nigronervosa*. *bioRxiv*. 2019. Preprint doi: 10.1101/609511. Publ. *Microbiome*. 2020;8:72. DOI 10.1186/s40168-020-00865-2.
- Mathé-Hubert H., Kaech H., Ganesanandamoorthy P., Vorburger C. Evolutionary costs and benefits of infection with diverse strains of *Spiroplasma* in pea aphids. *Evolution*. 2019;73(7):1466-1481. DOI 10.1111/evo.13740.
- Moreira M., Aguiar A.M.F., Bourtzis K., Latorre A., Khadem M. *Wolbachia* (Alphaproteobacteria: Rickettsiales) infections in isolated aphid populations from Oceanic Islands of the Azores Archipelago: revisiting the supergroups M and N. *Environ. Entomol.* 2019;48(2):326-334. DOI 10.1093/ee/nvy189.
- Nyabuga F.N., Outreman Y., Simon J.-C., Heckel D.G., Weisser W.W. Effects of pea aphid secondary endosymbionts on aphid resistance and development of the aphid parasitoid *Aphidius ervi*: a correlative study. *Entomol. Exp. Appl.* 2010;136(3):243-253. DOI 10.1111/j.1570-7458.2010.01021.x.
- Russell J.A., Weldon S., Smith A.H., Kim K.L., Hu Y., Łukasiak P., Doll S., Anastopoulos I., Novin M., Oliver K.M. Uncovering symbiont-driven genetic diversity across North American pea aphids. *Mol. Ecol.* 2013;22(7):2045-2059. DOI 10.1111/mec.12211.
- Sakurai M., Koga R., Tsuchida T., Meng X.-Y., Fukatsu T. *Rickettsia* symbiont in the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*: novel cellular tropism, effect on host fitness, and interaction with the essential symbiont *Buchnera*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2005;71(7):4069-4075. DOI 10.1128/AEM.71.7.4069-4075.2005.
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. *Molecular Cloning: a laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- Sanada-Morimura S., Matsumura M., Noda H. Male killing caused by a *Spiroplasma* symbiont in the small brown planthopper, *Laodelphax striatellus*. *J. Hered.* 2013;104(6):821-829. DOI 10.1093/jhered/est052.
- Shaikевич E., Bogacheva A., Rakova V., Ganushkina L., Ilinsky Y. *Wolbachia* symbionts in mosquitoes: intra- and intersubgroup recombinations, horizontal transmission and evolution. *Mol. Phylogenet. Evol.* 2019;134:24-34. DOI 10.1016/j.ympev.2019.01.020.
- Simon J.-C., Boutin S., Tsuchida T., Koga R., Le Gallie J.F., Frantz A., Outreman Y., Fukatsu T. Facultative symbiont infections affect aphid reproduction. *PLoS One*. 2011;6(7):e21831. DOI 10.1371/journal.pone.0021831.
- Simon J.-C., Sakurai M., Bonhomme J., Suchida T., Koga R., Fukatsu T. Elimination of a specialised facultative symbiont does not affect the

- reproductive mode of its aphid host. *Ecol. Entomol.* 2007;32(3): 296-301. DOI 10.1111/j.1365-2311.2007.00868.x.
- Smith A.H., Łukasik P., O'Connor M.P., Lee A., Mayo G., Drott M.T., Doll S., Tuttle R., Disciullo R.A., Messina A., Oliver K.M., Russell J.A. Patterns, causes and consequences of defensive microbiome dynamics across multiple scales. *Mol. Ecol.* 2015;24(5):1135-1149. DOI 10.1111/mec.13095.
- Stothard D.R., Clark J.B., Fuerst P.A. Ancestral divergence of *Rickettsia bellii* from the spotted fever and typhus groups of *Rickettsia* and antiquity of the genus *Rickettsia*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1994; 44(4):798-804.
- Tabata J., Hattori Y., Sakamoto H., Yukuhiro F., Fujii T., Kugimiya S., Mochizuki A., Ishikawa Y., Kageyama D. Male killing and incomplete inheritance of a novel *Spiroplasma* in the moth *Ostrinia zugliaevi*. *Microb. Ecol.* 2011;61:254-263. DOI 10.1007/s00248-010-9799-y.
- Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipowski A., Kumar S. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 2013;30(12):2725-2729. DOI 10.1093/molbev/mst197.
- Tinsley M., Majerus M. A new male-killing parasitism: *Spiroplasma* bacteria infect the ladybird beetle *Anisosticta novemdecimpunctata* (Coleoptera: Coccinellidae). *Parasitology.* 2006;132(6):757-765. DOI 10.1017/S0031182005009789.
- Tsuchida T., Koga R., Shibao H., Matsumoto T., Fukatsu T. Diversity and geographic distribution of secondary endosymbiotic bacteria in natural populations of the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*. *Mol. Ecol.* 2002;11(10):2123-2135. DOI 10.1046/j.1365-294x.2002.01606.x.
- Wang Z., Su X.-M., Wen J., Jiang Li-Y., Qiao G. Widespread infection and diverse infection patterns of *Wolbachia* in Chinese aphids. *Insect Sci.* 2014;21:313-325. DOI 10.1111/1744-7917.12102.
- Weinert L., Werren J., Aebi A., Stone G., Jiggins F. Evolution and diversity of *Rickettsia* bacteria. *BMC Biol.* 2009;7:6. DOI 10.1186/1741-7007-7-6.
- Zytynska S.E., Meyer S.T., Sturm S., Ullmann W., Mehrparvar M., Weisser W.W. Secondary bacterial symbiont community in aphids responds to plant diversity. *Oecologia.* 2016;180(3):735-747. DOI 10.1007/s00442-015-3488-y.
- Zytynska S.E., Weisser W.W. The natural occurrence of secondary bacterial symbionts in aphids. *Ecol. Entomol.* 2016;41:13-26. DOI 10.1111/een.12281.

ORCID ID

D.A. Romanov orcid.org/0000-0003-3340-9278
E.V. Shaikevich orcid.org/0000-0002-6504-5547

Благодарности. Работа поддержана грантом РФФИ № 19-04-00739. Работа Д.А. Романова по сбору тлей в Звенигороде и Люберцах выполнена в рамках государственного задания по проекту № 0112-2019-0002.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 14.04.2020. После доработки 01.07.2020. Принята к публикации 03.07.2020.