

ОБНАРУЖЕНИЕ ПАРАЗИТОИДОВ *PHALACROTOPHORA FASCIATA* (DIPTERA: PHORIDAE) И *OOMYZUS SCAPOSUS* (HYMENOPTERA: EULOPHIDAE) В КУКОЛКАХ *HARMONIA AXYRIDIS* КРЫМСКОГО ПОЛУОСТРОВА

© 2017 Романов Д.А.

Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, Москва 119991;
e-mail: dromanov_16@mail.ru

Поступила в редакцию 13.10.2017

Описываются новые случаи поражения особей инвазивного вида *Harmonia axyridis* Крымского полуострова нативными паразитоидами *Phalacrotophora fasciata* и *Oomyzus scaposus*.

Ключевые слова: *Harmonia axyridis*, инвазивные виды, нативные виды, паразитизм, *Phalacrotophora fasciata*, *Oomyzus scaposus*.

Введение

Божья коровка *Harmonia axyridis* (Pallas, 1773) (Coleoptera: Coccinellidae), происходящая из Восточной Азии [Kuznetsov, 1997], – хорошо известный хищник, питающийся различными видами тлей [Hodek, 1996], а также другими видами насекомых [Koch, 2003]. С начала 2000-х гг. происходит расселение *H. axyridis* по территории Европы [Roy et al., 2016], в 2013 г. было зафиксировано появление этого вида в Крыму (в Алуште) [Орлова-Беньковская, Могилевич, 2016].

В естественной среде обитания *H. axyridis* поражается несколькими паразитоидами. В Восточной Азии были обнаружены два паразитоида имаго божьих коровок: *Medina lucitiosa* (Meigen) (Diptera: Tachinidae) [Кузнецов, 1975, 1987] и *Dinocampus coccinellae* (Shrank) (Hymenoptera: Braconidae) [Liu, 1950; Koide, 1961]. Куколки *H. axyridis* поражаются мухами-горбатками *Phalacrotophora fasciata* (Fallen) и *P. philaxyridis* (Disney) (Diptera: Phoridae) [Филатова, 1974; Кузнецов, 1987], а также осами-тетрастихинами, в частности *Oomyzus scaposus* (Thomson) (Hymenoptera: Eulophidae) [Kuznetsov, 1997].

В данной работе описаны случаи обнаружения паразитирования *P. fasciata* и *O. scaposus*

в куколках *H. axyridis* инвазивной популяции Крыма.

Материалы и методы

Нами во второй половине июня 2017 г. были осуществлены сборы куколок и имаго *H. axyridis* в 5 городах Крымского полуострова: Севастополе, Ялте, Феодосии, Керчи и Симферополе. В Севастополе было собрано 7 личинок четвёртого возраста и 12 куколок; в Ялте – 6 куколок; в Феодосии – 5 личинок четвёртого возраста, 75 куколок; в Керчи – 25 куколок; в Симферополе – 77 куколок. Собранные на разных растениях куколки *H. axyridis* содержались в чашках Петри при комнатной температуре (~25 °C). Паразитоиды божьих коровок были найдены только в двух местах – в Ялте (*P. fasciata*) и Феодосии (*O. scaposus*).

Личинки *P. fasciata* развивались внутри куколок *H. axyridis*, перед окукливанием они их покинули и окуклились в чашке Петри, где и были обнаружены. Всего было собрано 8 куколок *P. fasciata*, из которых 3 были сразу помещены в 96%-й этанол, а остальные оставлены в чашке Петри при комнатной температуре. Имаго *P. fasciata* вывелись из всех 5 куколок примерно через 19 дней после сбора. Для идентификации вида паразитоида и про-

ведения молекулярно-генетического анализа из 3 куколок и 5 имаго были получены препараты тотальной ДНК.

Личинки *O. scaposus* развивались и окукливались внутри куколок хозяина. Вышедшие наружу имаго были собраны и помещены в 96%-й этанол. Для идентификации вида паразитоида и проведения молекулярно-генетического анализа из 3 имаго была выделена тотальная ДНК.

Выделение тотальной ДНК проводили методом фенол-хлороформной экстракции [Sambrook et al., 1989].

Реакцию амплификации проводили со всеми выделенными образцами ДНК в объёме 25 мкл с использованием универсального набора Encyclo Plus PCR kit (компания Евроген, Москва) в соответствии с протоколом фирмы-производителя. Для ПЦР применялись универсальные праймеры на 5'-конец гена *cox1*: LCO1490 (5'-GGTCAACAATCATAAAGATATTGG-3') и HCO2198 (5'-TAAACT TCAGGGTGACCAA AAAATCA-3') [Folmer et al., 1994]. Условия амплификации: начальная денатурация – 4 мин 30 с при 94 °С; затем 5 циклов: денатурация – 30 с при 94 °С, отжиг – 20 с при 45 °С и полимеризация – 1 мин при 72 °С; затем 35 циклов: денатурация – 30 с при 94 °С, отжиг – 20 с при 55 °С и полимеризация – 1 мин при 72 °С. ПЦР завершалась заключительной полимеризацией в течение 5 мин 72 °С. Реакции амплификации выполнялись на термоциклере T100 (компания Bio-Rad, США).

Результаты ПЦР визуализировались методом электрофореза в 1.5%-м агарозном геле. Элюция фрагментов из геля проводилась с использованием набора для выделения ДНК из агарозных гелей Cleanup Mini (компания Евроген, Москва) в соответствии с инструкциями фирмы-производителя. Очищенные фрагменты были секвенированы с двух праймеров (LCO1490 и HCO2198).

Хроматограммы сиквенсов анализировались с помощью комплекта программ DNASTAR Lasergene 6 [Clewley, 1995; Burland, 2000]. Для сравнения полученных нами сиквенсов с уже известными использовалась база данных Barcode of Life Database (Bold) [2017].

Результаты и обсуждение

Все 8 сиквенсов, полученных из куколок и имаго мух, оказались идентичны между собой, они соответствуют зарегистрированной последовательности *cox1 P. fasciata* (BOLD: ACE1464) на 100%. Из 6 собранных в Ялте куколок *H. axyridis* 3 оказались поражёнными *P. fasciata*. Следовательно, поражаемость куколок *H. axyridis* мухами *P. fasciata* в Ялте составляет 50%, хотя из-за слишком маленькой выборки это значение представляется неточным. В других пунктах наших сборов в Крыму данный паразитоид не был замечен. В Европе случаи паразитирования *P. fasciata* на куколках инвазивной популяции *H. axyridis* уже неоднократно были зафиксированы [Steenberg, Harding, 2010; Ware et al., 2010; Comont et al., 2014; Francati, 2015]. Мы впервые описали паразитирование *P. fasciata* на *H. axyridis* в Крыму.

Все полученные из имаго ос сиквенсы оказались идентичны между собой. Они соответствуют зарегистрированной последовательности *cox1 O. scaposus* (BOLD: ABX9553) на 98.3%. Из 75 куколок *H. axyridis* собранных в Феодосии лишь 2 оказались поражены осами. Следовательно, поражаемость куколок *H. axyridis* осами-тетрастихинами *O. scaposus* составляет 2.7%. В Англии уже был зафиксирован случай паразитирования *O. scaposus* в куколках инвазивной популяции *H. axyridis* [Comont et al., 2014]. Паразитирование *O. scaposus* на *H. axyridis* в Крыму нами описано впервые.

Заражение личинок и куколок *H. axyridis* и *P. fasciata*, и *O. scaposus* приводит к тому, что развитие жуков заканчивается на стадии куколок. Массовое размножение паразитоидов должно являться фактором, ограничивающим рост популяции вида-хозяина. Известно, что поражаемость кокцинеллид паразитоидами *O. scaposus* варьирует в широком диапазоне: так, осы поражают 10% 1-го поколения божьих коровок, 50–70% 2-го поколения, 90% и больше 3-го поколения [Рубцов, 1954]. Поражаемость куколок кокцинеллид мухами *Phalacrotophora* также сильно варьирует в зависимости от географических регионов, видов-хо-

зьев и климатических условий, и может достигать 80% [Disney, Chazeau, 1990; Disney et al., 1994].

Необходимы дальнейшие исследования для того, чтобы оценить роль паразитоидов в регулировании численности *H. axyridis* в Крыму.

Благодарности

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 16-16-00079.

Литература

- Кузнецов В.Н. Фауна и экология кокциnellид (Coleoptera, Coccinellidae) Приморского края // В сб.: Энтомологические исследования на Дальнем Востоке. Вып. 3. Труды биолого-почвенного ин-та. Владивосток: ДВНЦ АН СССР, 1975. Т. 28, вып. 131. С. 3–24.
- Кузнецов В.Н. Паразиты кокциnellид (Coleoptera, Coccinellidae) на Дальнем Востоке // В сб.: Новые данные по систематике насекомых Дальнего Востока / Под ред. П.А. Лер, Н.А. Сторожева. Труды биолого-почвенного ин-та. Владивосток: ДВО АН СССР, 1987. Т. 133, вып. 236. С. 17–22.
- Орлова-Беньковская М.Я., Могилевич Т.А. Первая находка *Harmonia axyridis* (Pallas, 1773) (Coleoptera: Coccinellidae) в Кабардино-Балкарской республике и история расселения этого чужеродного вида по Кавказу и югу Европейской России с 2002 по 2015 год // Кавказский энтомологический бюллетень. 2016. Т. 12. № 1. С. 93–98.
- Рубцов И.А. Цитрусые вредители и их природные враги. М.; Л.: АН СССР, 1954. 260 с.
- Филатова И.Т. Паразиты Coccinellidae (Coleoptera) Западной Сибири // В кн.: Фауна и экология насекомых Сибири / Под ред. Н.Г. Коломиец. Новосибирск: СО Наука, 1974. С. 173–185.
- Barcode of Life Database (BOLD) (Электронный ресурс) // (<http://www.barcodinglife.com/>). Проверено 10.09.2017.
- Burland T.G. DNASTAR's Lasergene sequence analysis software // Methods Mol. Biol. 2000. Vol. 132. P. 71–91.
- Clewley J.P. Macintosh sequence analysis software. DNASTAR's LaserGene // Mol. Biotechnol. 1995. Vol. 3. P. 221–224.
- Comont R.F., Purse B.V., Phillips W., Kunin W.E., Hanson M., Lewis O.T., Harrington R., Shortall C.R., Rondoni G., Roy H.E. Escape from parasitism by the invasive alien ladybird, *Harmonia axyridis* // Insect Conservation and Diversity. 2014. Vol. 7. Iss. 4. P. 334–342.
- Disney R.H.L., Chazeau J. The recognition and biology of *Phalacrotophora quadrimaculata* (Diptera: Phoridae) parasitising *Olla v-nigrum* (Coleoptera: Coccinellidae) used in attempts to control the *Leucaena psyllid* // Ann. Parasitol. Hum. Comp. 1990. Vol. 65. P. 98–100.
- Disney R.H.L., Majerus M.E.N., Walpole M.J. Phoridae (Diptera) parasitising Coccinellidae (Coleoptera) // Entomologist. 1994. Vol. 113. P. 28–42.
- 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. Vol. 3. P. 294–299.
- Francati S. Native preimaginal parasitism of *Harmonia axyridis*: new record of association with *Phalacrotophora fasciata* in Italy // Bulletin of Insectology. 2015. Vol. 68. P. 3–6.
- Hodek I. Food relationships // In: Ecology of Coccinellidae / Eds. Hodek I., Honek A. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1996. P. 143–238.
- Koch R.L. The multicolored Asian lady beetle, *Harmonia axyridis*: a review of its biology, uses in biological control, and non-target impacts // Journal of Insect Science. 2003. Vol. 3. P. 1–16.
- Koide T. Observations on *Perilitus coccinellae* (Shrank) // Gensei. 1961. Vol. 11. P. 1–5.
- Kuznetsov V.N. Lady beetles of the Russian Far East. Gainesville: Sandhill Crane Press, 1997. P. 248.
- Liu C.L. Contribution to the knowledge of Chinese Coccinellidae. X. Occurrence of *Perilitus coccinellae* (Shrank), a parasite of adult Coccinellidae in North China (Hymenoptera, Braconidae) // Entomol. News. 1950. Vol. 61. P. 207–208.
- Roy H.E., Brown P.M.J., Adriaens T., Berkvens N., Borges I., Clusella-Trullas S., Comont R.F., De Clerq P., Eschen R., Estoup A., Evans E.W., Facon B., Gardiner M.M., Gil A., Grez A.A., Guillemaud T., Haelewaters D., Herz A., Honek A., Howe A.G., Hui C., Hutchison W.D., Kenis M., Koch R.L., Kulfan J., Handley L.L., Lombaert E., Loomans A., Losey J., Lukashuk A.O., Maes D., Magro A., Murray K.M., Martin G.S., Martinkova Z., Minnaar I.A., Nedved O., Orlova-Bienkowskaja M.J., Osawa N., Rabitsch W., Ravn H.P., Rondoni G., Rorke S.L., Ryndevich S.K., Saethre M-G., Sloggett J.J., Soares A.O., Stals R., Tinsley M.C., Vandereycken A., van Wielink P., Vigišová S., Zach P., Zakharov I.A., Zaviero T., Zhao Z. The harlequin ladybird, *Harmonia axyridis*: global perspectives on invasion history and ecology // Biological Invasions. 2016. Vol. 18. Iss. 4. P. 997–1044.
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. In 3 volumes, 2nd edition. New York, Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. P. 1626.
- Stenberg T., Harding S. The harlequin ladybird (*Harmonia axyridis*) in Denmark: spread, phenology, colour forms and natural enemies in the early phase of establishment // IOBC/wprs Bulletin. 2010. Vol. 58. P. 143–147.
- Ware R., Michie L.-J., Otani T., Rhule E., Hall R. Adaptation of native parasitoids to a novel host: the invasive coccinellid *Harmonia axyridis* // IOBC/wprs Bulletin. 2010. Vol. 58. P. 175–178.

FINDING OF PARASITOIDS *PHALACROTOPHORA FASCIATA* (DIPTERA: PHORIDAE) AND *OOMYZUS SCAPOSUS* (HYMENOPTERA: EULOPHIDAE) IN PUPAS OF *HARMONIA AXYRIDIS* OF THE CRIMEA

© 2017 Romanov D.A.

Vavilov Institute of General Genetics of the RAS, Moscow, 119991;
e-mail: dromanov_16@mail.ru

New events of parasitization of Crimean *Harmonia axyridis* ladybird's pupas by native parasitoids *Phalacrotophora fasciata* and *Oomyzus scaposus* are described.

Key words: *Harmonia axyridis*, invasive species, native species, pupal parasitism, *Phalacrotophora fasciata*, *Oomyzus scaposus*.