

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТАГЕНОМНОГО ПОДХОДА К АНАЛИЗУ МИКРОБИОМОВ НАСЕКОМЫХ-ФИТОФАГОВ

**Баранов О.Ю.<sup>1</sup>, Пантелеев С.В.<sup>1</sup>, Романенко М.О.<sup>2</sup>,  
Колганихина Г.Б.<sup>3</sup>, Ярмолович В.А.<sup>2</sup>, Пашкевич И.А.<sup>4</sup>**

<sup>1</sup>ГНУ «Институт леса НАН Беларуси»

(г. Гомель, Беларусь)

<sup>2</sup>УО «Белорусский государственный технологический университет»

(г. Минск, Беларусь)

<sup>3</sup>ФГБУН «Институт лесоведения РАН»

(н.п. Успенское, РФ)

<sup>4</sup>УО «Белорусский государственный университет»

(г. Минск, Беларусь)

*В работе рассмотрены методологические аспекты использования метагеномного подхода для оценки структуры микробиомов насекомых-фитофагов листовых древесных растений. Информативность получаемых результатов определения видовой структуры выше по сравнению с методами, основанными на применении видоспецифических праймеров. Данный метод диагностики может быть применим при работе с различными типами образцов насекомых, включая и энтомологические коллекции. При этом в ходе анализа имеется возможность диагностики сообществ патогенов.*

Микробиом представляет собой сообщество микроорганизмов, населяющих определенную среду обитания, включая и живые организмы [1]. Многие виды насекомых-фитофагов могут выступать к качестве основного вектора распространения трансмиссивных заболеваний, при этом перенос фитопатогенов может быть неспецифическим – патогены, в виде спор или иных структур переносятся на внешней поверхности или внутренних полостях тела и др., или специфическим, когда возбудитель инфекции либо размножается и накапливается в организме переносчика, либо созревает до инвазионной стадии. Следует отметить, что в случае топической приуроченности фитопатогена к переносчику, у последнего, как правило, в организме имеются специализированные структуры, служащие для культивирования и переноса биологического материала возбудителей инфекций [2].

Исследование особенностей структуры и трансформации микробиомов фитопатогенов представляет собой важную научную задачу, являющуюся одним из базисов для последующего изучения и определения основных механизмов и закономерностей направленности формирования патосистем. Актуальность данных исследований также обусловлена ограниченными возможностями традиционных микробиологических и микроскопических методов для проведения сравнительной оценки сообществ фитопатогенных микроорганизмов лесных пород, что и обусловило наличие незначительного числа публикаций по данному направлению [3]. В связи с развитием методов секвенирования геномов и интенсивным накоплением в базах данных генети-

ческой информации, в последнее время наибольшую популярность приобрел метагеномный подход к анализу микробных сообществ.

На наш взгляд, наиболее информативным подходом к молекулярно-генетическому анализу микробиомов насекомых является качественная и количественная оценка маркерных локусов патогенов, что позволяет осуществлять их видовую диагностику и определять титр клеток микроорганизмов.

В качестве ортологичных локусов для проведения сравнения сообществ микромицетов был выбран первый внутренний транскрибируемый спейсер рДНК (ITS1), для бактерий – фрагмент гена 16S рРНК. Как было показано нами ранее, применительно к микромицетам, длина ITS1-локуса является для вида величиной постоянной и специфичной, что позволяет на основании данного признака диагностировать основные группы фитопатогенов [4]. Видовая идентификация бактериальных видов основана на типировании длин терминальных фрагментов, получаемых в ходе рестрикции [5].

Материал для анализа был собран весной-летом 2020 года на территории лесхозов Минского и Гомельского ГПЛХО с пяти лиственных древесных пород: березы, осины, клена, дуба, ольхи. Собранные виды насекомых относились к отрядам жесткокрылые (усачи, долгоносики, слоники, заболонники и др.) и полужесткокрылые (клопы, тли и др.).

Выделение ДНК, проведение ПЦР-амплификации и электрофоретического типирования выполнялось на основании ранее описанных методик [6]. Обозначение грибных и бактериальных видов при проведении оценки их долевого участия и сравнения микробиомов производилось как с использованием бинарных таксономических названий, так и на основе использования значений молекулярного размера маркерных регионов ITS1 или t-16S. Так, например, *Sphaerulina betula* Quaedvl., Verkley ex Crous составил была обозначена как 225, *Ophiognomonia intermedia* (Rehm) Sogonov – 268, *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl. – 244, *Phyllactinia guttata* (Wallr.) Lev. – 314, *Botryosphaeria dothidea* (Moug. ex Fr.) Ces. & De Not. – 259, *Microsphaera betulae* Magn. – 298, *Melampsorium betulinum* (Pers.) Kleb. – 328, *Pythium* sp. 1 – 298, *Fusarium* sp.4 – 233, *Nectria* sp.2 – 217 и др.

В ходе молекулярно-генетического анализа микробиомов в пределах одного и того же вида насекомого могли диагностироваться как сходные, так и различные по структуре и видовому составу сообщества микроорганизмов. Моновидовые микробиоценозы в большинстве случаев были диагностированы при анализе *Saperda perforate* Pallas, *Byctiscus populi* L., *Pyrrhocoris apterus* L., *Pyrrhidium sanguineum* L. и др. Для *Scolytus ratzeburgi* Jans. и *Scolytus intricatus* Rat. зачастую были характерны поливидовые спектры как микромицетов, так и бактериальных видов, включая *Erwinia* spp. и *Pseudomonas* spp.

В целом, проведенное изучение электрофоретических спектров, позволяло идентифицировать до 12 грибных и 14 бактериальных видов в образце, что в значительной степени является информативным по сравнению с методами, основанными на применении мультиплексных наборов видоспецифических праймеров, рассчитанных на одновременную диагностику, как правило, не более 5-6 видов. Кроме того, данный подход к метагеномному анализу характеризуется бы-

стротой выполнения (4-5 часов) и меньшей стоимостью ( $\approx 3$  USD) по сравнению с алгоритмами, использующими технологию секвенирования. Кроме того, использование маркерных локусов относительно небольшой длины, позволяло фиксировать метагеномные спектры у различных типов образцов насекомых, включая и фиксированные препараты. Последующее использование методов кластерного анализа позволяет сравнивать структуры микробиомов, как на основе вариаций видового состава, или долевого участия того или иного вида.

*Работа была частично поддержана грантами БРФФИ Б20Р-175 и РФФИ №20-54-00045.*

### Литература

1. Dyakov, Yu. Comprehensive and Molecular Phytopathology / Yu. Dyakov, V. Dzhavakhiya, T. Korpela. – Amsterdam : Elsevier, 2007. – 496 p.
2. Maramorosch, K. Multiplication of plant viruses in insect vectors / K. Maramorosch // *Advances in virus research*. – Academic Press, 1955. – V. 3. – P. 221-249.
3. McDonald, B.A. The population genetics of fungi: tools and techniques / B.A. McDonald // *Phytopathology*. – 1997. – Vol. 87, № 4. – P. 448-453.
4. Genetic identification of fungi colonizing seedlings of the Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) in the forest nursery in Korenevka (Belarus) / O. Yu. Baranov, T. Oszako, Y.A. Nowakowska, S. V. Panteleev // *Folia Forestalia Polonica*. – 2010. – Vol. 52, № 1. – P. 61-64.
5. Arteau, M., Labrie, S., Roy, D. Terminal-restriction fragment length polymorphism and automated ribosomal intergenic spacer analysis profiling of fungal communities in Camembert cheese / M. Arteau, S. Labrie, D. Roy // *Int. Dairy J.* – 2010. – Vol. 20. – P. 545-554.
6. Падутов, В.Е. Методы молекулярно-генетического анализа / В.Е. Падутов, О.Ю. Баранов, Е.В. Воропаев. – Минск: Юнипол, 2007. – 176 с.

### THE UTILIZATION OF A METAGENOMIC APPROACH TO ANALYSIS OF THE PHYTOPHAGOUS INSECTS MICROBIOMES

*Baranov O.Yu., Panteleev S.V., Romanenko M.O.,  
Kolganikhina G.B., Yarmolovich V.A., Pashkevich I.A.*

*Methodological aspects of using the metagenomic approach to assess the microbiome structure of phytophagous insects of deciduous woody plants were discussed. The information content of the results obtained for the determination of the species structure is higher in comparison with the methods based on the use of species-specific primers. This diagnostic method can be applied when working with various types of insect samples, including entomological collections. At the same time, during the analysis, it is possible to diagnose both individual types of pathogens and their communities.*

