

14. Schulz B., Boyle C., Draeger S., Rommert A.K., Krohn K. Endophytic fungi: A source of novel biologically active secondary metabolites. *Mycol. Res.* 2002. 106: 996–1004.
15. Panaccione D.G., Beaulieu W.T., Cook D. Bioactive alkaloids in vertically transmitted fungal endophytes. *Functional Ecol.* 2014. 28: 299–314.
16. Hammer T. J., Bowers M. D. Gut microbes may facilitate insect herbivory of chemically defended plants. *Oecologia*. 2015. 179 (1): 1-14.

**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПДАФ-МАРКЕРОВ
ДЛЯ МЕТАГЕНОМНОГО АНАЛИЗА МИКРОБИОМОВ
НАСЕКОМЫХ-ВРЕДИТЕЛЕЙ ЛИСТВЕННЫХ ПОРОД БЕЛАРУСИ**

**Падутов А.В.¹, Середич М.О.², Ярмолович В.А.²,
Пашкевич И.А.³, Баранов О.Ю.¹**

¹Институт леса НАН Беларуси РАН, arger2011@yandex.by;

²Белорусский государственный технологический университет,
Romina_mo@bk.ru, yarm@belstu.by;

³НПЦ по биоресурсам НАН Беларуси, igunapashkevich@mail.ru

**THE USE OF PLAF MARKERS FOR METAGENOMIC ANALYSIS OF
MICROBIOMES OF INSECT PESTS OF DECIDUOUS
SPECIES OF BELARUS**

**Padutov A.V., Siaredzich M.O., Yarmolovich V.A.,
Pashkevich I.A., Baranov O.Yu.**

The size of rDNA ITS1 and ITS2 loci is constant and specific to most fungal species. Electrophoretic analysis of ITS1 and ITS2 loci (PLAF) allows the identification of the fungal component of microbiomes in insects. PLAF approach can be used to screen for different fungal pathogens in pests. When coupled with appropriate sanitation strategies, and if identified early, this information can help significantly reduce disease outbreaks.

Трансмиссивные заболевания растений – это группа инфекционных заболеваний, возбудители которых передаются от больного индивидуума к здоровому с помощью организмов-переносчиков. В качестве основных переносчиков инфекционных агентов лиственных пород как правило выступают различные виды беспозвоночных животных, и в первую очередь насекомые. Перенос возбудителя может быть механическим (или 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. При этом зачастую в организме переносчика имеются специализированные структуры, служащие для культивирования и переноса биологического материала фитопатогенов.

Несмотря на то, что данный способ распространения свойственен многим видам фитопатогенных микромицетов, бактерий и вирусов, в имеющихся литературных источниках представлено лишь незначительное количество исследований в области трансмиссивных инфекций лесных пород, а данные о переносе возбудителей заболеваний являются разрозненными и неполными, что связано с отсутствием до настоящего времени соответствующих методов анализа, позволяющих выполнять достоверную диагностику фитопатогенов. Появление технологий ДНК-маркирования позволило выполнять идентификацию фитопатогенов на качественно новом уровне, что связано с аналитическими преимуществами ДНК-маркеров перед остальными группами методов, включая раннюю диагностику болезней, точность определения и быстроту выполнения анализов.

Проведенные широкомасштабные молекулярно-генетические исследования различных грибных и бактериальных организмов позволили установить общегрупповые ортологичные локусы ДНК фитопатогенов, и на их основе разработать наборы универсальных праймеров для их ПЦР-амплификации.

На основании особенностей нуклеотидной структуры рядом авторов предложены способы видовой идентификации грибов без проведения предварительного секвенирования образцов – на основе электрофоретической оценки размеров маркерных регионов. Сравнительный анализ используемых для идентификации микромицетов электрофоретических подходов представлены в обзорной работе Счока с соавторами [1]. Следует отметить, что большинство предложенных протоколов не являются универсальными, и имеют ограничения при выполнении фитопатологической диагностики различного типа. Так, использование в качестве ДНК-маркера межгенного спайсера (IGS) может быть ограничено при работе с патогенными базидиомицетами, вследствие широкого диапазона варьирования данного региона и невозможностью амплификации локусов размером, превышающим 3 тыс. п. н. (в частности при анализе деградированных тканей) [2]. Использование метода SSCP-анализа не позволяет напрямую использовать данные нуклеотидной структуры локусов, что соответственно ограничивает использование

электронных баз данных в качестве диагностикумов [3]. В случае применения сложных условий пробоподготовки и электрофоретического фракционирования возрастает вероятность возникновения методических ошибок и получения разного рода артефактов [4]. Кроме того, использование многокомпонентных методик ограничивает широкое применения методов ДНК-маркирования, вследствие высокой себестоимости анализов и необходимости наличия соответствующей лабораторной базы.

В настоящей работе в качестве маркерных локусов для анализа грибной составляющей микробиомов насекомых предложено использование внутренних транскрибуемых спейсеров ITS1 и ITS2, изменчивость которых с диагностической точки зрения является информативной и достаточной для идентификации доминирующих видов патогенов. При этом внутривидовой полиморфизм, связанный с вариабельностью размера транскрибуемых спейсеров микромицетов практически отсутствует, что исключает получение ложноотрицательных результатов. Анализ размера ампликонов осуществляется в условиях денатурирующего полиакриламидного гель-электрофореза, что позволяет проводить видовую идентификацию как с применением стандартных ДНК-образцов (диагностикумов), а также использовать материалы электронных баз данных.

Электрофоретические спектры метагеномов, в случае отсутствия грибных видов, будут характеризоваться отсутствием продуктов амплификации, а в случае наличия биологического материала микромицетов – будут содержать одну или более электрофоретических фракций, соответствующих тому или иному виду. Идентификация того или иного вида фитопатогена устанавливается на основании наличия соответствующей ему зоны в ПЦР-спектре образцов.

Так, транскрибуемого спейсера ITS1, размер фракции ПЦР продукта для *Sphaerulina betula* Quaedvli., Verkley ex Crous составит 225 н.о., *Ophiognomonia intermedia* (Rehm) Sogonov – 268 н.о., *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl. – 244 н.о., *Phyllactinia guttata* (Wallr.) Lev. – 314 н.о., *Botryosphaeria dothidea* (Moug. ex Fr.) Ces. & De Not. – 259 н.о., *Microsphaera betulae* Magn. – 298 н.о., *Melampsoridium betulinum* (Pers.) Kleb. – 328 н.о., *Pythium* sp. – 298 н.о., *Phytophthora cactorum* (Leb. and Cohn) Schroeter – 295 н.о., *Fusarium avenaceum* (Fr.) Sacc. – 233 н.о., *Melanconium bicolor* Nees. – 270 н.о., *Nectria* sp. – 217 н.о. Для верификации полученных результатов можно дополнительно использовать локус ITS2, размеры которого для отмеченных видов также являются специфическими.

Представленный молекулярно-генетический метод типировки характеризуется быстрой выполнения (4-5 часов) и меньшей стоимостью

(≈ 3 USD) по сравнению с алгоритмами, использующими технологию секвенирования. Достоверность получаемых результатов видовой идентификации выше по сравнению с методами, основанными на применении видоспецифических праймеров, вследствие отсутствия кросс-амплификации. 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 как отдельных видов патогенов, так и их сообществ.

Работа была частично поддержана грантом БРФФИ Б20Р-175

Литература

1. C. L. Schocha, K. A. Seifertb, S. Huhndorf [et al.] Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi // PNAS - 2012 - V. 109, №16 – P. 6241–6246.
2. Arteau, M., Labrie, S., Roy, D., 2010. Terminal-restriction fragment length polymorphism and automated ribosomal intergenic spacer analysis profiling of fungal communities in Camembert cheese. Int. Dairy J. 20 (8), 545-554.
3. Callon, C., Delbès, C., Duthoit, F., Montel, M.C., 2006. Application of SSCP-PCR fingerprinting to profile the yeast community in raw milk Salers cheeses. Syst. Appl. Microbiol. 29 (2), 172-180.
4. Gori, K., Ryssel, M., Arneborg, N., Jespersen, L., 2013. Isolation and identification of the microbiota of Danish farmhouse and industrially produced surface-ripened cheeses. Microb. Ecol. 65 (3), 602-615.

ОЦЕНКА ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ ШЕСТИЗУБЧАТОГО КОРОЕДА НА ТЕРРИТОРИИ БЕЛАРУСИ

Пантелейев С.В., Разумова О.А., Баранов О.Ю.

Институт леса НАН Беларуси, e-mail stasikdesu@mail.ru

ASSESSMENT OF GENETIC DIVERSITY OF THE SIX-TOOTHED BARK BEETLE IN THE TERRITORY OF BELARUS

Panteleev S.V., Razumova O.A., Baranov O.Yu.

Molecular genetic research of Belarusian populations of the six-toothed bark beetle were carried out. 53 variants of genotypes were identified for the mtCOI marker locus. In the studied geographic regions