

Продолжение таблицы

Вид	Хозяин
Подсемейство Macrocentrinae	
<i>Macrocentrus buoliana</i> Eady & Clark, 1964	Чешуекрылые (Lepidoptera)
<i>Macrocentrus bicolor</i> Curtis, 1833	Чешуекрылые (Lepidoptera)
Подсемейство Cenocoeliinae	
<i>Cenocoelius secalis</i> (Linnaeus, 1758)	Cerambycidae: * <i>Monochamus sutor</i> Linnaeus, 1758; * <i>Pogonocherus decoratus</i> Fairmaire, 1855; * <i>P. eugeniae</i> Ganglbauer, 1891; * <i>P. fasciculatus</i> (DeGeer, 1775); <i>P. hispidus</i> (Linnaeus, 1758). Curculionidae: * <i>Ips typographus</i> (Linnaeus, 1758); * <i>Magdalis phlegmatica</i> (Herbst, 1797); * <i>M. rufa</i> Germar, 1824; <i>M. ruficornis</i> Linnaeus, 1758; <i>M. violacea</i> (Linnaeus, 1758); * <i>Pissodes validirostris</i> (R. F. Sahlberg, 1834); <i>Thamnophilus nitidus</i> Gyllenhal, 1827.

Примечание: данные по хозяевам приведены по Yu et al., 2012; Тобиас, 1986; Белокобыльский, Тобиас, 2000.

Звездочкой (*) отмечены виды хозяев, повреждающие виды рода *Pinus* L.

**РОЛЬ ЭНДОФИТОВ *ABIES SIBIRICA* LEDEB.
ВО ВЗАИМООТНОШЕНИИ С *POLYGRAPHUS PROXIMUS*
BLANDFORD И ЕГОМИКРОБИОМОМ НА ФОНЕ
ИНТЕНСИВНОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ КОРНЕВЫХ ПАТОГЕНОВ
И КЛИМАТИЧЕСКИХ АНОМАЛИЙ**

Павлов И.Н.^{1,2}, Литовка Ю.А.^{1,2}

¹ Институт леса им. В.Н. Сукачева СО РАН, ФИЦ КНЦ,
e-mail forester24@mail.ru

² Сибирский государственный университет науки и технологий им.
М.Ф. Решетнева,

**THE ROLE OF ENDOPHYTES *ABIES SIBIRICA* LEDEB.
IN RELATIONSHIP WITH *POLYGRAPHUS PROXIMUS*
BLANDFORD AND ITS MICROBIOME IN INTENSIVE IMPACT OF
ROOT PATHOGENS AND CLIMATE ANOMALIES**

Pavlov I.N.^{1,2}, Litovka Yu.A.^{1,2}

The mycobiome of *Abies sibirica* with symptoms of damage by phytopathogens and *Polygraphus proximus*, and the microbiome of *P. Proximus*, was studied by isolating total DNA from samples. Mycocenosis of

A. sibirica contains insect mycoassociants (*Geosmithia*, *Ophiostoma*, etc.); phytopathogens (*Neonectria*, *Sydowia*, etc.); endophytes or transitional forms (*Pestalotiopsis*, *Coniochaeta*, etc.); entomopathogens (*Beauveria*, *Cordyceps*). Endophytes restrict the development of phytopathogens and the penetration of insect pests. Phyllophages are also able to overcome the protective barrier, especially in the presence of associated toxin-destroying microbial communities.

Исследуемые нами внезапные и стремительные процессы усыхания хвойных лесов в Сибири и на Дальнем Востоке без их предварительного ослабления (снижения ростовых процессов, уменьшения продолжительности жизни хвои) и при отсутствии значимых погодных аномалий (сильные засухи, затопление) свидетельствует о наличии скрытых процессов, которые развиваются длительное время внутри растений и способствуют их колонизации фитопатогенами. Древостои *Abies sibirica* Ledeb., в силу физиологических и анатомо-морфологических особенностей растений, подвержены интенсивному биотическому воздействию (1). Текущие климатические изменения на территории произрастания *A. sibirica* также являются одним из триггеров массового усыхания темнохвойных лесов, интенсивность которого возрастает за счет массового перемещения посадочного материала и древесины. Несмотря на это, *A. sibirica* занимает обширные пространства и хорошо возобновляется под пологом леса, что свидетельствует о наличии долговременной устойчивости, механизмы которой выработаны в процессе коэволюции растения с вредителями и возбудителями болезней. Важнейшим механизмом устойчивости является наличие эндофитных микроорганизмов, которые обитают в растительных тканях в течение всего или части жизненного цикла, не вызывая явных симптомов заболевания и оказывая влияние на рост растения, состояние и развитие болезни (2). Эндофиты обеспечивают увеличение биомассы корней и / или побегов (3); азотфиксацию, синтез регуляторов роста, дополнительное обеспечение растения питательными веществами и водой (4); защиту растений от насекомых и патогенов (5); повышение устойчивости растений к абиотическим стрессам за счет продуцирования гормонов роста (6).

Первое сообщение о роли эндофита *Phomopsis oblonga* (Desm.) Traverso в борьбе с насекомыми-переносчиками голландской болезни вяза (7) привлекло особое внимание к роли эндофитных микроорганизмов в биологическом контроле насекомых-вредителей. Эндофитные штаммы *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill., выделенные из кукурузы, оказались эффективнее коммерческих энтомопатогенных

штаммов, используемых в Бразилии для ограничения численности *Rhipicephalus microplus* Canestrini (8).

Сибирские штаммы *B. bassiana*, выделенные нами из имаго *Polygraphus proximus* Blandford (9) и древесины *A. sibirica*, также показали высокую эффективность в экспериментах *in vitro*. Развитие микоза инфицированных насекомых сопровождалось замедлением моторики; массовая смертность короеда (до 97 % особей) отмечена на 5–7-е сутки; реизоляция исходных штаммов энтомопатогенов из погибших особей составила 75–95 % при отсутствии *B. bassiana* в контрольной группе жуков.

Особенностью эндофитного образа жизни является способность микроорганизмов переходить от бессимптомного к сапротрофному или патогенному режиму при изменении условий окружающей среды. Характер взаимодействия растений с эндофитами варьируется от мутуализма до патогенности в зависимости от абиотических и биотических факторов, включая генотипы растений и микроорганизмов, условия окружающей среды, динамическую сеть взаимодействий в биоме растений (10). Например, гриб *Sphaeropsis sapinea* (Fr.) Dyko & B. Sutton способен бессимптомно персистировать в дереве-хозяине и переходить к патогенезу при благоприятных значениях температуры и влажности (11).

Исследование эндофитных микроорганизмов невозможно без привлечения современных молекулярно-генетических методов, базирующихся на выделении тотальной ДНК и последующем ее анализе (метабаркодинг и метагеномика). По результатам проведенного нами метагеномного анализа образцов древесины *A. sibirica* с симптомами поражения фитопатогенными грибами и короедом *P. proximus* определена структура микобиоты, представители которой могут играть определенную роль как в патогенезе (особенно, при существенном ослаблении растения), так и в стимулировании защитной реакции *A. sibirica* на присутствие фитопатогенов и насекомых-вредителей.

Регион ITS2 был амплифицирован с помощью праймеров ITS3_KYO2 и ITS4, содержащих адаптерные последовательности (Illumina), линкер и баркод (12). Секвенирование проводили в ЦКП «Геномика» СО РАН (ИХБФМ СО РАН) на секвенаторе MiSeq (Illumina), используя набор Reagent Kit v3 (2x300, Illumina). Биоинформатическая обработка включала перекрывание парных ридов, фильтрацию по качеству и длине, учет одинаковых последовательностей, отбрасывание синглетонов, удаление химер и получение OTU с помощью алгоритма кластеризации UPARSE/UNOISE. Таксономическая принадлежность последовательностей OTU определялась с помощью SINTAX (13).

В результате прочтения суммарной ДНК с ITS2-ITS4 праймерами были определены консервативные участки длиной не менее 10000 п.н., соответствующие домену Fungi. Биоинформатический анализ данных позволил получить 550 ридов (OTU), со средней длиной 300 п.н. и определенным количеством прочтений для каждого образца. В древесине *A. sibirica* выявлены наиболее типичные представители микобиоты, которым соответствует количество прочтений в сумме более 1 % ридов от общего их количества. Это микоассоцианты насекомых из родов *Geosmithia*, *Ophiostoma*, *Knufia*, *Kuraishia*, *Graphium*, в том числе фитопатогенные ассоцианты уссурийского полиграфа; фитопатогенные грибы – *Neonectria*, *Sydowia*, *Elsinoe*, *Gibberella*, *Valsa*, *Botryotinia*, *Taphrina* и др. (среди которых масштабами поражения выделяется стволовой вредитель *Neonectria fuckeliana* (C. Booth) Castl. & Rossman); эндофиты либо переходные формы – *Pestalotiopsis*, *Coniochaeta*, *Pleonectria*, *Phaeomoniella*, *Mycosphaerella*, *Cladophialophora*, *Toxicodendrosporium*, *Rhodotorula*, *Lophiostoma*; энтомопатогены – *Beauveria*, *Cordyceps*.

Биологически активные метаболиты, продуцируемые эндофитными грибами, способны ограничить развитие фитопатогенных грибов (14) и препятствовать проникновению насекомых вредителей (15). Кроме того, эндофитный механизм защиты растений включает индукцию их собственной системной резистентности; паразитизм; конкуренцию за пространство и субстрат; регуляцию метаболизма хозяина в их тонко сбалансированной ассоциации. Однако, несмотря на способность эндофитов обеспечивать защиту растения от насекомых-вредителей, филлофаги способны преодолевать защитный барьер при наличии ассоциированными с ними микробных сообществ, биодеградирующих токсичные для насекомых соединения (16). Это является важным элементом коэволюции насекомых и растений.

По результатам проведенного нами метагеномного анализа образцов короеда *P. proximus*, извлеченных из древесины *A. sibirica*, определена структура его микробиома. Среди грибов доминирующее положение занимают представители родов *Ophiostoma*, *Pichia*, *Candida*, *Hypogymnia*, *Ramalina*, *Davidiella* и *Sistotrema* (более 5 % прочтений OTU от общего количества); среди бактерий – *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Lysinibacillus*, *Serratia*, *Bacillus*, *Chryseobacterium*, *Erwinia*.

Литература

1. Pavlov I.N. Biotic and Abiotic Factors as Causes of Coniferous Forests Dieback in Siberia and Far East. Contemporary Problems of Ecology. 2015. 8 (4): 499–515.

2. Terhonen E., Blumenstein K., Kovalchuk A., Asiegbu F.O. Forest tree microbiomes and associated fungal endophytes: Functional roles and impact on forest health. *Forests*. 2019. 10 (1): 42.
3. Rodriguez R.J., White Jr J.F., Arnold A.E., Redman A.R.A. Fungal endophytes: diversity and functional roles. *New phytologist*. 2009. 182(2): 314–330.
4. Prieto K.R, Echaide-Aquino F., Huerta-Robles A., Valerio H.P., Macedo-Raygoza G., Prado F.M. Endophytic bacteria and rare earth elements; promising candidates for nutrient use efficiency in plants, in *Plant Macronutrient Use Efficiency*. 2017. Academic Press, Cambridge, MA, pp. 285–302.
5. Verma S.K., Kingsley K.L., Bergen M.S., Kowalski K.P., White J.F. Fungal disease protection in rice (*Oryza sativa*) seedlings by growth promoting seed-associated endophytic bacteria from invasive *Phragmites australis*. *MDPI: Microorganisms*. 2018. 6.
6. Lacava P. T., Azevedo J. L. Biological control of insect-pest and diseases by endophytes. *Advances in Endophytic research*. 2014. Springer, New Delhi. P. 231–256.
7. Webber J. A natural control of Dutch elm disease. *Nature*. 1981. 292: 449–451
8. Campos R.A., Boldo J.T., Pimentel I.C., ... Barros N. M. Endophytic and entomopathogenic strains of *Beauveria sp.* to control the bovine tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Genetics and Molecular Research*. 2010. 9(3): 421–1430.
9. Pavlov I.N., Litovka Y.A., Golubev D.V.,...Petrenko S. M. Mass Reproduction of *Polygraphus proximus* Blandford in Fir Forests of Siberia Infected with Root and Stem Pathogens: Monitoring, Patterns, and Biological Control. *Contemporary Problems of Ecology*. 2020. 13 (1): 71–84.
10. Hardoim P.R. van Overbeek L.S., Berg G., ... Sessitsch A. The hidden world within plants: ecological and evolutionary considerations for defining functioning of microbial endophytes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2015. 79 (3): 293-320.
11. Stanosz G.R., Smith D.R., Guthmiller M.A., Stanosz J.C. Persistence of *Sphaeropsis sapinea* on or in asymptomatic shoots of red and Jack pines. *Mycologia*. 1997. 89: 525-230.
12. Fadrosch D.W., Ma B., Gajer P., Sengamalay N., Ott S., Brotman R.M., Ravel J. *Microbiome*. 2014. 2(1): 6. An improved dual-indexing approach for multiplexed 16S rRNA gene sequencing on the Illumina MiSeq platform.
13. Edgar R.C. UNOISE2: Improved error-correction for Illumina 16S and ITS amplicon reads. 2016. bioRxiv doi:10.1101/081257.

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, Ярмолевич 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, irynapashkevich@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