

## СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА СТРУКТУРЫ МИКОБИОМОВ ФИТОФАГОВ ДУБА ЧЕРЕШЧАТОГО НА ОСНОВЕ ДАННЫХ ФРАГМЕНТНОГО АНАЛИЗА ЛОКУСА ITS1

Баранов О.Ю.<sup>1</sup>, Иващенко Л.О.<sup>2</sup>, Пантелеев С.В.<sup>1</sup>,  
Колганихина Г.Б.<sup>3</sup>, Сазонов А.А.<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Институт леса НАН Беларуси  
(г. Гомель, Беларусь)

<sup>2</sup>БГТУ

(г. Минск, Беларусь)

<sup>3</sup>Институт лесоведения РАН  
(н.п. Успенское, Московская область, РФ)

<sup>4</sup>Белгослес

(г. Минск, Беларусь)

*С использованием технологии фрагментного анализа (локус ITS1) изучена структура метагеномов микобиомов насекомых-фитофагов дуба черешчатого. Получены электрофоретические профили метагеномов микромицетов для 28 видов насекомых из отрядов Полужесткокрылые (Hemiptera), Чешуекрылые (Lepidoptera) и Жесткокрылые (Coleoptera) и проведена их сравнительная оценка. Выявлены особенности формирования структуры микобиомов (включая видовое разнообразие и частоту встречаемости видов) для изученных насекомых-фитофагов дуба черешчатого.*

### ВВЕДЕНИЕ

Одним из биотических факторов, определяющих состояние дубовых насаждений, являются инфекционные заболевания [1]. Согласно данным Учреждения «Беллесозащита», общая площадь очагов инфекционных болезней дуба на начало 2021 года составила порядка 3,8 тысячи га, или 1,3% от суммарной площади дубрав Беларуси [2]. Наибольшее количество очагов болезней было зафиксировано в южной части Беларуси, что связано как с особенностью зонального распределения дубрав по территории республики, так и с ухудшением климатических и эдафогидрологических условий для его произрастания в данном регионе, вызвавших снижение устойчивости насаждений. Данная тенденция отмечена не только в Беларуси, а наблюдается по всей южной части ареала дуба черешчатого и обусловлена глобальным смещением границ его распространения в северном направлении [3-5]. Среди болезней дуба преобладают (более 99%) инфекции, вызванные различными видами фитопатогенных грибов: стволовые гнили, некрозно-раковые болезни стволов и ветвей, сосудистые микозы, корневые гнили и мучнистая роса листьев [2].

Процессы усыхания дубрав могут носить как хронический, так и острый характер [6-8]. Массовое усыхание дубовых древостоев на территории Центральной и Восточной Европы наблюдалось регулярно с интервалами в 10-12

лет, при этом возникновение наиболее крупных патологических процессов отмечено с периодичностью в 20-30 лет [9].

Кроме хронического усыхания дубрав, в значительной части стран Западной и Центральной Европы, включая и сопредельные с Беларусью, в припевающих и спелых дубовых насаждениях отмечаются два стремительно развивающихся патологических процесса, обозначаемые как SOD (от англ. Sudden Oak Death, «внезапная смерть дуба») вызываемая патогенным оомицетом *Phytophthora ramorum* [10], и AOD (от англ. Acute Oak Decline, «резкое усыхание дуба»), вызываемое в основном фитопатогенными бактериями *Gibbsiella quercinecans* и *Brenneria goodwinii* [11]. Особенностью данных заболеваний является быстрое наступление гибели деревьев (4-5 лет с момента появления первых симптомов) и высокая скорость распространения инфекции, что обусловлено трансмиссивным способом передачи через насекомых-вредителей. Данные явления до настоящего времени не зафиксированы лесопатологическими службами в Беларуси, однако, на наш взгляд, представляют собой потенциальную опасность для насаждений дуба в Беларуси.

Среди описанных в литературе грибных заболеваний дуба, трансмиссивный характер передачи достоверно определен только для сосудистого микоза (возбудители – *Ceratocystis* spp.), векторами которого могут выступать представители подсемейства короеды Scolytinae. При этом, наиболее значимым переносчиком грибов рода *Ceratocystis*, по мнению большинства исследователей, считается дубовый заболонник *Scolytus intricatus* Ratzeburg [12].

В настоящее время, в связи с интенсивным внедрением молекулярно-генетических методов в области лесной фитопатологии, изучение сообщества микроорганизмов различных видов насекомых-вредителей явилось одним перспективных направлений, связанных с раскрытием вопросов инфекционного патогенеза [13]. При этом, при изучении микробиома используются два основных подхода: поиск целевого патогена в составе микробиоты (видоспецифический анализ) и оценка всего видового комплекса микроорганизмов (метагеномный анализ). Последний способ позволяет определить не только видовой состав микроорганизмов, но также предоставить количественные данные по их долевному участию в микробиоме [14].

Несмотря на значительный объем проведенных метагеномных исследований микробиомов насекомых-вредителей лесных пород, имеющиеся на сегодняшний день данные о разнообразии и видовой структуре ассоциаций векторов и фитопатогенных грибов дуба являются разрозненными и неполными, что не позволяет своевременно производить оценку рисков и разработку стратегий предотвращения формирования очагов его инфекций, распространяемых с помощью насекомых [15, 16]. Что же касается лесных насаждений Беларуси – исследования микробиомов насекомых-вредителей дуба до настоящего времени практически не проводились. Применение в данном аспекте метагеномных подходов, по нашему мнению, позволит не только полностью изучить разнообразие микробиома насекомых-фитофагов, но явиться основой для установления биологических механизмов и закономерностей формирования инфекционного процесса применительно к трансмиссивным заболеваниям дуба.

Исходя из всего вышесказанного, целью данной работы являлось проведение сравнительного метагеномного анализа микобиома фитофагов дуба черешчатого на основании типирования размеров локуса ITS1. Полученные метагеномные данные позволят в последующем (после проведения секвенирования основных выявленных вариантов ITS1) охарактеризовать перечень микровицетов, распространяемых с помощью насекомых-переносчиков.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Экспериментальный материал (образцы насекомых из отрядов Полужесткокрылые (Hemiptera), Чешуекрылые (Lepidoptera), Жесткокрылые (жуки) (Coleoptera)) был собран в различных частях кроны деревьев дуба черешчатого, произрастающих на территории Лельчицкого и Лунинецкого лесхозов. Общее количество образцов насекомых составило 116 шт.

Получение препаратов суммарной ДНК из образцов насекомых проводили с использованием модифицированного СТАВ-протокола [17].

В качестве маркерных локусов были выбраны: фрагмент гена субъединицы 1 цитохром с-оксидазы (mtCOI) – проведение видовой идентификации насекомых-фитофагов, внутренний транскрибируемый спейсер ITS1 рДНК – метагеномный анализ микобиомов насекомых.

Полимеразная цепная реакция осуществлялась с применением набора ArtMix Форез (2X) (АртБиоТех, Беларусь) согласно инструкции фирмы-производителя. Амплификация маркерных локусов mtCOI и ITS1 осуществлялась с применением сочетаний праймеров LCO1490/HCO2198 и ITS1F/ITS2, соответственно [18, 19].

Секвенирование локуса mtCOI насекомых и фрагментный анализ ампликонов ITS1 микровицетов осуществлялись на базе генетического анализатора Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific, США) согласно протоколов фирмы-производителя. Интерпретация получаемых данных выполнялась с использованием программных пакетов Sequencing Analysis v. 5.1.1 – секвенирование, и GeneMapper v. 4.1 – фрагментный анализ (Thermo Fisher Scientific, США). Видовая идентификация секвенированных нуклеотидных последовательностей образцов насекомых проводилась в базе данных NCBI GenBank (Национальный центр биотехнологической информации, США) [20]. Обозначение видов микровицетов при проведении сравнительной оценки микобиомов производилось на основании использования не бинарного таксономического названия, а значения молекулярного размера маркерного региона ITS1 [21]. Основные характеристики структуры метагеномов микобиомов (перечень видов и их долевое участие) в цифровом формате заносились в базу данных и анализировались с помощью программного пакета Statistica 6.0 (StatSoft Inc., США).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

В результате проведенной генетико-таксономической оценки образцов насекомых в базе данных GenBank NCBI идентифицировано 28 видов Insecta из отрядов Полужесткокрылые (Hemiptera), Чешуекрылые (Lepidoptera), Жесткокрылые (жуки) (Coleoptera): *Acrobasis consociella* Hübner, *Altica quercetorum* Foudras, *Amphipyra berbera* Rungs, *Anaspis frontalis* L., *Anaspis thoracica* L., *Athous subfuscus* Müller, *Caryocolum pullatella* Tengström, *Cimberis attelaboides* Fabricius, *Conistra vaccinii* L., *Contacyphon padi* L., *Contacyphon variabilis* Thunberg, *Cyphon pubescens* Fabricius, *Ectropis crepuscularia* Denis & Schiffermüller, *Ennomos quercinaria* Hufnagel, *Erannis defoliaria* Clerck, *Eudemis profundana* Denis & Schiffermüller, *Euproctis chrysorrhoea* L., *Eupsilia transversa* Hufnagel, *Kleidocerys resedae* Panzer, *Lithophane socia* Hufnagel, *Lymantria dispar* L., *Malachius bipustulatus* L., *Orgyia antiqua* L., *Orthosia incerta* Hufnagel, *Paraphotistus nigricornis* Panzer, *Phratora laticollis* Suffrian, *Ypsolopha ustella* Clerck, *Zeiraphera isertana* Fabricius.

Изучение структуры метагеномов микобиомов исследованных образцов насекомых показало, что среднее число диагностируемых видов в ассоциациях составило 9,03 (с долевым участием  $\geq 1\%$ ), 5,29 (с долевым участием  $\geq 5\%$ ) и 3,18 (с долевым участием  $\geq 10\%$ ). При этом, количество выявляемых микромицетов у различных образцов и видов насекомых варьировалось в значительной степени (рисунок 1). Так, максимальное число детектируемых видов (с долевым участием  $\geq 1\%$ ) в образце составило 20 шт., и было выявлено в единичном случае у имаго долгоносика *Cimberis attelaboides*. Наибольшее число видов микромицетов (с долевым участием в микробиоме  $\geq 5\%$ ) в пробе не превысило 9 шт., и было диагностировано у 4% образцов насекомых. К данной группе относятся образцы имаго ложного цветочного жука *Anaspis thoracica*. Микобиомы, содержащие не менее 6 видов микромицетов (с частотой встречаемости не менее 10%), диагностированы у 3% образцов насекомых, включая образцы гусениц совки воинственной (*Eupsilia transversa*) и золотистого шелкопряда (*Euproctis chrysorrhoea*).

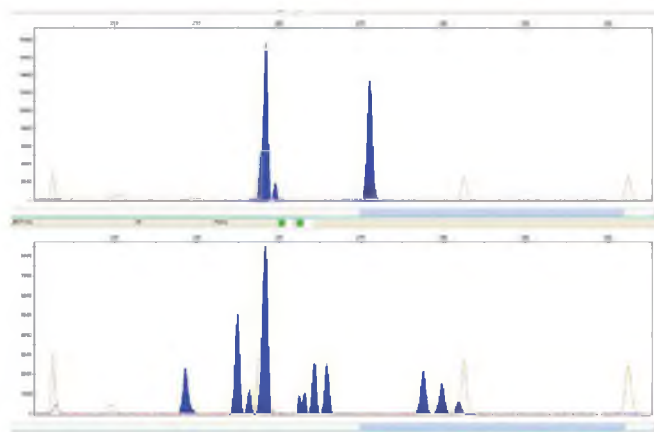


Рисунок 1 –Электрофоретические спектры метагеномов микобиомов гусениц *Ectropis crepuscularia* (вверху) и *Zeiraphera isertana* (внизу)

Наименьший уровень таксономического разнообразия микромицетов (3 вида, с долевым участием  $\geq 1\%$ ) был диагностирован у ряда образцов гусениц пяденицы пихтовой (*Ectropis crepuscularia*), дубовой общественной огневки (*Acrobasis consociella*) и совки воинственной (*Eupsilia transversa*). Микобиомы данных образцов были представлены одним-двумя доминирующими ОТЕ, с долевым участием в спектрах не менее 40%.

Основные параметры, описывающие уровень видового разнообразия и степень различий (в пределах видов насекомых-фитофагов) метагеномов, приведены в таблице.

Таблица – Основные параметры, характеризующие особенности структуры метагеномов микробиомов насекомых-фитофагов дуба черешчатого

| Вид насекомого                   | Среднее число микромицетов |            |             | Индекс Шеннона | Индекс Симпсона | Степень дифференциации в пределах вида |
|----------------------------------|----------------------------|------------|-------------|----------------|-----------------|----------------------------------------|
|                                  | $\geq 1\%$                 | $\geq 5\%$ | $\geq 10\%$ |                |                 |                                        |
| <i>Acrobasis consociella</i>     | 6,8                        | 3,5        | 3,3         | 1,302          | 0,287           | 0,30-0,44                              |
| <i>Altica quercetorum</i>        | 6,0                        | 5,1        | 3,5         | 1,455          | 0,292           | 0,45-0,52                              |
| <i>Amphipyra berbera</i>         | 5,5                        | 3,5        | 2,5         | 1,006          | 0,490           | 0,25-0,37                              |
| <i>Anaspis frontalis</i>         | 9,5                        | 6,1        | 5,2         | 1,77           | 0,216           | 0,22-0,38                              |
| <i>Anaspis thoracica</i>         | 18,0                       | 7,5        | 2,5         | 2,469          | 0,121           | 0,30-0,41                              |
| <i>Athous subfuscus</i>          | 5,9                        | 5,2        | 5,0         | 1,577          | 0,213           | 0,18-0,46                              |
| <i>Caryocolum pullatella</i>     | 9,2                        | 6,1        | 5,1         | 1,943          | 0,162           | 0,21-0,39                              |
| <i>Cimberis attelaboides</i>     | 16,2                       | 8,0        | 3,5         | 2,326          | 0,128           | 0,24-0,38                              |
| <i>Conistra vaccinii</i>         | 10,0                       | 4,8        | 2,6         | 1,589          | 0,326           | 0,06-0,46                              |
| <i>Contacyphon padi</i>          | 8,2                        | 7,4        | 3,1         | 1,798          | 0,212           | 0,09-0,28                              |
| <i>Contacyphon variabilis</i>    | 14,2                       | 7,1        | 3,2         | 2,235          | 0,147           | 0,22-0,44                              |
| <i>Cyphon pubescens</i>          | 13,1                       | 8,4        | 2,0         | 2,209          | 0,147           | 0,17-0,39                              |
| <i>Ectropis crepuscularia</i>    | 3,1                        | 3,0        | 2,3         | 0,858          | 0,458           | 0,34-0,42                              |
| <i>Ennomos quercinaria</i>       | 4,5                        | 2,6        | 2,1         | 0,583          | 0,705           | 0,21-0,33                              |
| <i>Erannis defoliaria</i>        | 4,3                        | 1,1        | 1,0         | 0,373          | 0,843           | 0,14-0,35                              |
| <i>Eudemis profundana</i>        | 10,7                       | 6,0        | 3,2         | 1,826          | 0,216           | 0,38-0,46                              |
| <i>Euproctis chrysorrhoea</i>    | 11,3                       | 8,4        | 6,0         | 2,22           | 0,119           | 0,34-0,38                              |
| <i>Eupsilia transversa</i>       | 8,0                        | 5,1        | 3,1         | 1,501          | 0,366           | 0,18-0,96                              |
| <i>Kleidocerys resedae</i>       | 8,5                        | 7,5        | 4,5         | 1,999          | 0,191           | 0,31-0,44                              |
| <i>Lithophane socia</i>          | 5,2                        | 3,3        | 3,1         | 0,818          | 0,578           | 0,42-0,48                              |
| <i>Lymantria dispar</i>          | 6,7                        | 4,3        | 2,7         | 1,309          | 0,382           | 0,24-0,53                              |
| <i>Malachius bipustulatus</i>    | 6,1                        | 4,2        | 2,1         | 1,045          | 0,477           | 0,21-0,36                              |
| <i>Orgyia antiqua</i>            | 5,2                        | 4,5        | 4,1         | 1,268          | 0,342           | 0,25-0,47                              |
| <i>Orthosia incerta</i>          | 8,1                        | 5,2        | 3,9         | 1,481          | 0,309           | 0,19-0,38                              |
| <i>Paraphotistus nigricornis</i> | 5,2                        | 3,1        | 1,9         | 0,834          | 0,592           | 0,32-0,51                              |
| <i>Phratora laticollis</i>       | 12,5                       | 7,5        | 4,5         | 2,196          | 0,135           | 0,18-0,29                              |
| <i>Ypsolopha ustella</i>         | 10,3                       | 3,9        | 1,8         | 1,746          | 0,252           | 0,31-0,55                              |
| <i>Zeiraphera isertana</i>       | 8,7                        | 6,0        | 2,3         | 1,604          | 0,874           | 0,18-0,31                              |

Как следует из таблицы, наибольшим уровнем видового разнообразия характеризовались не только отдельные образцы, но и виды Coleoptera: *Anaspis thoracica*, *Cimberis attelaboides* и *Phratora laticollis*. Среди

Lepidoptera, максимальное число видов было диагностировано у гусениц *Euproctis chrysorrhoea*. Данные результаты могут быть объяснены особенностями биологии (в т.ч. уровнем мобильности и размером площади обитания) имаго жуков и гусениц бабочек. Еще одним аспектом, описывающим уровень видового разнообразия микобиомов насекомых явилась оценка меры доминирования тех или иных видов. Установлено, что наименьшие значения индекса Симпсона (таблица), как правило, выявлялись у образцов с наибольшими показателями уровня видового разнообразия, указывая на особенности формирования структур метагеномов – за счет видов с низкой частотой встречаемости и по всей видимости не имеющих таксоноспецифической (применительно к насекомому-хозяину) приуроченности.

Детальный анализ молекулярно-генетических профилей показал, что в целом, общее количество идентифицированных вариантов (по размеру локуса ITS1) генотипов микромицетов насекомых составило 131 шт. и было приравнено к числу выделяемых оперативных таксономических единиц (ОТЕ). Диагностированные оперативные таксономические единицы (в случае генотипов ITS1) могут представлять собой как отдельные или близкородственные виды ( $D_{ITS1} < 0.03$ ), так и видовые комплексы, не обладающие четкими молекулярно-генетическими различиями по данному региону рДНК. Среди выявленных ОТЕ, наибольшей представленностью в изученной выборке характеризовался генотип ITS1<sup>252</sup> (идентифицирован как *Verticillium* sp.), диагностированный у 75,0% образцов насекомых со средней частотой встречаемости 32,29%. Меньшие значения частоты встречаемости (6,21% и 5,59%) отмечены для генотипов ITS1<sup>267</sup> и ITS1<sup>318</sup>, соответственно. Средняя представленность в метагеномных спектрах генотипов ITS1<sup>265</sup>, ITS1<sup>237</sup>, ITS1<sup>252</sup> и ITS1<sup>263</sup> находилась в диапазоне от 3% до 4%. Число генотипов с долевым участием в спектрах около 2% не превысило 7 шт., 1% – 26 шт.

Проведенная сравнительная оценка видовых структур микобиомов насекомых показала, что отдельные их варианты (по спектру видов и частот их встречаемости) могут быть приурочены к тому или иному таксону Insecta. Так, на рисунке 2 приведена дендрограмма, иллюстрирующая степень различий в структуре метагеномов образцов 11 видов насекомых. Как, видно из рисунка 2, на дендрограмме присутствуют несколько обособленных кластеров, степень дифференциации между которыми превышает 0,4.

При этом, в состав как кластеров, так и субкластеров, могут входить как одинаковые, так и систематически различающиеся виды насекомых, что указывает на отсутствие специфической приуроченности доминирующих идентифицированных ОТЕ микромицетов к тому или иному вектору. В то же время, при детальном рассмотрении структуры микобиомов отдельных видов фитофагов, были выявлены определенные закономерности в формировании консорциев. Так, например, у дубовой общественной огневки (*Acrobasis consociella*), уменьшение долевого участия доминирующего микромицета с генотипом ITS1<sup>252</sup>, было связано с его замещением видами с генотипом ITS1<sup>318</sup> и ITS1<sup>269</sup>. В случае совки черничной (*Conistra vaccinii*), трансформация метагенома происходила за счет увеличения представленности генотипов

ITS1<sup>335</sup> и ITS1<sup>265</sup>. Сходный характер изменений был выявлен и для близкого по экологическим характеристикам вида – совки воинственной (*Eupsilia transversa*) – замещающим ОТЕ ITS1<sup>252</sup> также явился микромицет с генотипом ITS1<sup>265</sup>. В то же время, генотип ITS1<sup>335</sup> в структуре метагенома совки воинственной не был встречен ни в одном образце.

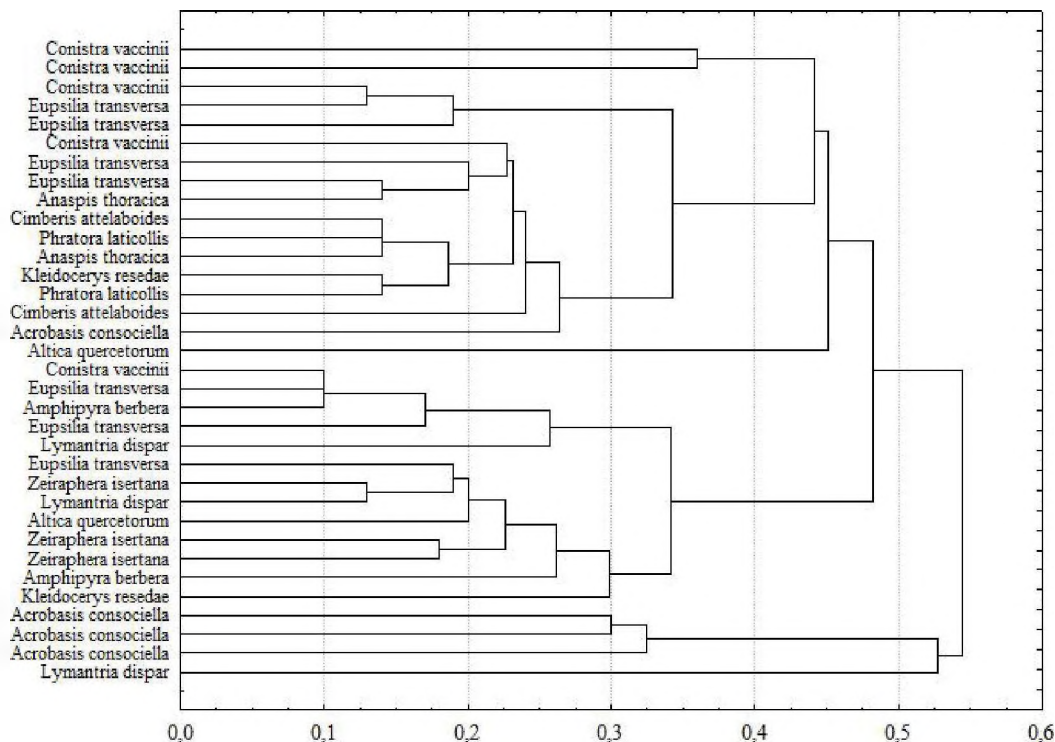


Рисунок 2 – Дендрограмма, иллюстрирующая степень различия структур метагеномов микобиомов 11 видов насекомых-фитофагов дуба черешчатого

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе проведенного исследования установлено, что изученные 28 видов насекомых являются переносчиками широкого (более 130 таксонов) спектра микромицетов, многие из которых могут проявлять фитопатогенные свойства. Характер переноса идентифицированных видов грибных организмов является неспецифическим, что выражалось как в отсутствии строгой ассоциации в системе «насекомое-микромицет», так и выявлении одного и того же вида микроорганизма у систематически далеких таксонов насекомых. Наибольший уровень видового разнообразия микобиомов был выявлен у фитофагов отряда Жесткокрылые (Coleoptera).

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

## ЛИТЕРАТУРА

1. Федоров, Н.И. Лесная фитопатология: учеб. для студентов специальности «Лесное хозяйство» / Н.И. Федоров. – Минск: БГТУ, 2004. – 462 с.
2. Государственное учреждение по защите и мониторингу леса «Беллесозащита» [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.bellesozaschita.by/>. – Дата доступа: 02.01.2021
3. Rodríguez-Calcerrada, J. Drought-induced oak decline – factors involved, physiological dysfunctions, and potential attenuation by forestry practices / J. Rodríguez-Calcerrada [et al.] // Oaks Physiological Ecology. Exploring the Functional Diversity of Genus *Quercus* L. – Springer, Cham, 2017. – С. 419-451.
4. Gagen, M. The tree ring growth histories of UK native oaks as a tool for investigating Chronic Oak Decline: An example from the Forest of Dean / M. Gagen [et al.] // Dendrochronologia. – 2019. – V. 55. – С. 50-59.
5. Romagnoli, M. Climate factors and oak decline based on tree-ring analysis. A case study of peri-urban forest in the Mediterranean area / M. Romagnoli [et al.] // Urban Forestry & Urban Greening. – 2018. – V. 34. – С. 17-28.
6. Brown, N. Acute Oak Decline and *Agrilus biguttatus*: the co-occurrence of stem bleeding and D-shaped emergence holes in Great Britain / N. Brown [et al.] // Forests. – 2017. – T. 8. – № 3. – С. 87.
7. Duque-Lazo, J. Forecasting oak decline caused by *Phytophthora cinnamomi* in Andalusia: Identification of priority areas for intervention / Duque-Lazo J. [et al.] // Forest ecology and management. – 2018. – V. 417. – С. 122-136.
8. Селочник, Н.Н. Усыхание дуба на территории СНГ / Н.Н. Селочник // Лесохозяйственная информация. – М., ВНИИЛМ, 2002. – № 3. – С. 42-54.
9. Сазонов А.А., Звягинцев В.Б. К вопросу о причинах массового усыхания дубовых лесов Беларуси в начале XXI века // Проблемы лесоведения и лесоводства: сборник научных трудов ИЛ НАН Беларуси. – Вып. 70. – Гомель: ИЛ НАН Беларуси, 2010. – С. 572-588.
10. Grünwald, N.J. Ecology and evolution of the sudden oak death pathogen *Phytophthora ramorum* / N.J. Grünwald, J.M. LeBoldus, R.C. Hamelin // Annual Review of Phytopathology. – 2019. – V. 57. – С. 301-321.
11. Crampton, B.G. A multiplex real-time PCR assay enables simultaneous rapid detection and quantification of bacteria associated with acute oak decline / B.G. Crampton [et al.] // Plant Pathology. – 2020. – T. 69. – № 7. – С. 1301-1310.
12. Doganlar, M. Some biological aspects of the European oak bark beetle, *Scolytus intricatus* (Ratz.) (Col., Scolytidae) in the northern parts of Germany (BRD) / M. Doganlar, R. Schopf // Zeitschrift für Angewandte Entomologie. – 1984. – V. 97. – №. 1-5. – С. 153-162.
13. Jongman, M. Technological advances in phytopathogen detection and metagenome profiling techniques / M. Jongman, P.C. Carmichael, M. Bill // Current microbiology. – 2020. – V. 77. – № 4. – С. 675-681.
14. Sleator, R. D. Metagenomics / R.D. Sleator, C. Shortall, C. Hill // Letters in applied microbiology. – 2008. – V. 47. – № 5. – С. 361-366.

15. Denman, S. Microbiome and infectivity studies reveal complex polyspecies tree disease in Acute Oak Decline / Denman S. [et al.] // The ISME journal. – 2018. – T. 12. – № 2. – С. 386-399.
16. Kowalik, V. The interaction of *Saccharomyces paradoxus* with its natural competitors on oak bark / V. Kowalik, E. Miller, D. Greig // Molecular ecology. – 2015. – V. 24. – № 7. – С. 1596-1610.
17. Падутов, В.Е. Методы молекулярно-генетического анализа / В.Е. Падутов, О. Ю. Баранов, Е. В. Воропаев. – Минск: Юнипол, 2007. – 176 с.
18. Folmer, O. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates / O. Folmer [et al.] // Molecular Marine Biology and Biotechnology. 1994. V. 3, N 5. P. 294-299.
19. White, T.J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics / T.J. White [et al.] // PCR Protocols: A guide to methods and applications / ed.: M. A. Innis [et al.]. – New York, 1990. – P. 315-322.
20. GenBank / D.A. Benson [et al.] // Nucleic acids research. – 2013. – Vol. 41. – P. 36-42.
21. Баранов, О.Ю. Метагеномный анализ смешанных инфекций посадочного материала в лесных питомниках / О.Ю. Баранов, С.В. Пантелеев, В.А. Ярмолович // Сб. науч. тр. / НАН Беларуси, Институт леса. – Гомель, 2014. – Вып. 74: Проблемы лесоведения и лесоводства. – С. 159-169.

#### **COMPARATIVE ESTIMATION OF THE STRUCTURE OF PHYTOPHAGES MYCOBIOMES OF PEDUNCULATE OAK BASED ON FRAGMENT ANALYSIS OF THE ITS1 LOCUS**

*Baranov O.Yu., Ivashchenko L.O., Panteleev S.V.,  
Kolganikhina G.B., Sazonov A.A.*

*Using the fragment analysis technology (marker locus – ITS1), the structure of the metagenomes of the mycobiomes of phytophagous insects of the pedunculate oak was studied. The electrophoretic profiles of micromycete metagenomes were obtained for 28 insect species from the orders Hemiptera, Lepidoptera, and Coleoptera, and their comparative evaluation was carried out. The features of the formation of the structure of mycobiomes (including species diversity and frequency of occurrence of species) for the studied phytophagous insects of the pedunculate oak were revealed.*

**Статья поступила в редколлегию 22.04.2021 г.**

