

ИЗУЧЕНИЕ БАКТЕРИАЛЬНОГО ЭЛЕМЕНТА МИКРОБИОМА НАСЕКОМЫХ-ФИТОФАГОВ ЛЕСНЫХ ПОРОД БЕЛАРУСИ МЕТОДОМ Т-ПДРФ

Л.О. ИВАЩЕНКО¹, О.Ю. БАРАНОВ², С.В. ПАНТЕЛЕЕВ², А.А. САЗОНОВ³, М.О. РОМАНЕНКО¹

¹Белорусский государственный технологический университет, г. Минск, Беларусь (lyba281997@mail.ru)

²Институт леса НАН Беларуси, г. Гомель, Беларусь (betula-belarus@mail.ru)

³РУП «Белгослес», г. Минск, Беларусь (lesopatolog@rambler.ru)

STUDY OF THE INSECTS MICROBIOME USING THE T-RFLP METHOD (ON THE EXAMPLE OF PHYTOPHAGES OF FOREST TREE SPECIES IN BELARUS)

L. IVASHCHENKO¹, O. BARANOV², S. PANTELEEV², A. SAZONOV³, M. RAMANENKA¹

¹Belarussian State Technological University, Minsk, Belarus (lyba281997@mail.ru)

²Institute of Forest, National Academy of Sciences of Belarus, Gomel, Belarus (betula-belarus@mail.ru)

³Republican Unitary Enterprise "Belgosles", Minsk, Belarus (lesopatolog@rambler.ru)

Насекомые могут выступать в качестве основного вектора распространения различных фитопатогенных микроорганизмов, включая грибы, бактерии и вирусы. В настоящее время изучение ассоциаций в системе «растение–насекомое–переносчик–фитопатоген» является актуальным направлением исследований в области лесопатологии, поскольку механизмы формирования большого количества патосистем лесных древесных пород являются малоизученными, а имеющиеся в литературе данные о способах распространения патогенов зачастую являются разрозненными и противоречивыми.

Подходы к изучению видовой структуры микробных сообществ насекомых за последнее десятилетие претерпели значительное изменение. Наряду с методами, основанными на метагенетическом анализе регионов 16S рДНК и 23S рДНК, широко используются подходы генетического профилирования с использованием различных технологий, включая денатурирующий градиентный гель-электрофорез (DGGE), анализ конформационного полиморфизма однонитчатой ДНК (SSCP), полиморфизм длины терминальных рестрикционных фрагментов (T-RFLP, или Т-ПДРФ). Основным преимуществом используемых генетических маркеров, является возможность изучения бактериального разнообразия микробиомов, не прибегая к выделению и культивированию микробных клеток в лабораторных условиях [1–3].

Т-ПДРФ-метод – это молекулярно-генетический метод, основанный на фрагментировании изучаемых локусов эндонуклеазами (рестриктазами), с последующим анализом размеров концевых фрагментов рестриктов посредством гель-электрофореза высокой степени разрешения. Использование данного метода позволяет проводить диагностику генетических различий между штаммами, а также производить оценку видовой структуры, пространственной и временной изменчивости микробных сообществ. Т-ПДРФ-метод обладает высокой чувствительностью и производительностью, что делает его информативным инструментом для проведения сравнительного анализа микробиомов [4].

Целью данной работы явилось изучение бактериального сообщества насекомых-фитофагов и энтомофагов хвойных и лиственных пород Беларуси, на основании использования Т-ПДРФ-метода.

Объектами исследования явились различные виды насекомых-фитофагов и энтомофагов – представители отрядов Жесткокрылые, Двукрылые, Перепончатокрылые, собранных на хвойных и лиственных породах (ель, сосна, дуб, береза, осина) в 5 лесхозах Гродненского, Гомельского и Минского ГПЛХО.

Выделение ДНК проводили на основании модифицированного СТАВ-протокола из целостных образцов насекомых [5]. ПЦР-амплификация варибельного V3–V4 региона гена 16S рРНК бактерий была произведена с использованием универсального набора праймеров для бактерий, меченных флуоресцентными красителями FAM и HEX [6]. По результатам Т-ПДРФ-анализа были получены ДНК-профили фрагментов гена 16S рРНК, описывающие структуру микробного сообщества по двум параметрам – размер терминального рестрикционного фрагмента маркерного гена (положение определенного пика в ПДРФ профиле) и доля этого фрагмента в электрофоретическом спектре (высота пика). Анализ фрагментов проводили с помощью программного обеспечения GeneMapper v. 4.1 (Thermo Fisher Scientific, США).

Видовая идентификация доминирующих групп бактерий была основана на типировании размеров терминальных фрагментов согласно базы данных секвенированных и идентифицированных в NCBI GenBank референсных образцов.

Результаты, полученные при проведении исследований, представлены в таблице 1.

Таблица 1. Доминирующие виды бактерий, выявленные при анализе образцов насекомых

Вид насекомого	Характер питания	Порода	Максимальное количество видов бактерий (долевое участие >1%)	Доминирующие виды бактерий
<i>Ips typographus</i> (имаго)	фитофаг	ель	1	<i>Erwinia</i> sp
<i>Rhagium inquisitor</i> (личинка)	фитофаг		6	<i>Sphingomonas</i> sp. <i>Bacillus</i> sp.2
<i>Medetera signaticornis</i> (личинка)	энтомофаг		12	<i>Bacillus</i> sp.1 <i>Sphingomonas paucimobilis</i> <i>Sphingomonas</i> sp. <i>Wolbachia endosymbiont</i> <i>Enterobacteriaceae</i> sp. <i>Ralstonia</i> sp.
<i>Thanasimus</i> sp.	энтомофаг		1	<i>Burkholderia contaminans</i> – эндофит растений, рост-стимулирующая бактерия, антагонист некоторых патогенов
<i>Corticeus</i> sp.	фитофаг		1	<i>Pragia fontium</i> – свободноживущая бактерия <i>Pantoea</i> sp. nov. <i>Rickettsia endosymbiont</i> – эндосимбионт насекомых
<i>Buprestidae</i> sp.	фитофаг	сосна	1	<i>Sodalis-like</i> symbiont – эндосимбионт насекомых
<i>Phaenops cyanea</i> (личинка)	фитофаг		12	<i>Bacillus</i> sp.1 <i>Sphingomonas paucimobilis</i> <i>Sphingomonas</i> sp. <i>Acinetobacter</i> sp. <i>Enterobacteriaceae</i> sp.
<i>Monochamus galloprovincialis</i> (личинка)	фитофаг		8	<i>Sphingomonas</i> sp. <i>Enterobacteriaceae</i> sp., <i>Ralstonia</i> sp.
<i>Pissodes piniphilus</i> (личинка)	фитофаг		5	<i>Bacillus</i> sp.2
<i>Lymexylon navale</i> (личинка)	фитофаг	дуб	9	<i>Sphingomonas</i> sp.
<i>Saperda perforata</i> (личинка)	фитофаг	осина	15	<i>Bacillus</i> sp.1 <i>Enterobacteriaceae</i> sp. <i>Ralstonia</i> sp. <i>Bacillus</i> sp.2
<i>Rusticoclytus rusticus</i> (личинка)	фитофаг		11	<i>Acinetobacter</i> sp. <i>Xanthomonas</i> sp. <i>Burkholderia</i> sp. <i>Ralstonia</i> sp.
<i>Saperda scalaris</i> (имаго)	фитофаг		5	<i>Bacillus</i> sp.1 <i>Xanthomonas</i> sp. <i>Ralstonia</i> sp. <i>Acinetobacter</i> sp.
<i>Scolytus retzeburgi</i> (личинка)	фитофаг	береза	13	<i>Acinetobacter</i> sp. <i>Enterobacteriaceae</i> sp., <i>Ralstonia</i> sp. <i>Sphingomonas paucimobilis</i> <i>Sphingomonas</i> sp. <i>Bacillus</i> sp.2

Проведенный сравнительный анализ электрофоретических данных, позволил идентифицировать до 15 видов бактерий в отдельных образцах насекомых. В пределах одного и того же вида насекомого, как правило, диагностировались сходные по видовому составу сообщества микроорганизмов. Наиболь-

шим уровнем видового разнообразия характеризовались микробиомы представителей отряда Жесткокрылые, что может быть связано с их высокой миграционной способностью.

Наиболее часто встречаемыми были бактерии родов *Bacillus*, *Sphingomonas*, *Ralstonia*, большинство из которых являются сапрофитами. Наибольший интерес представляет выделение из организмов насекомых бактерий из родов *Erwinia*, *Burkholderia*, *Pentoea*, *Pectobacterium*, *Rickettsia*, представители которых зачастую характеризуются выраженными фитопатогенными свойствами. В то же время, как следует из таблицы 1, большинство (11 из 16) бактерий по маркерному региону V3–V4 гена 16S рРНК были идентифицированы только до рода, что требует использования дополнительных маркеров для детализации видовой структуры микробиомов.

ЛИТЕРАТУРА: [1] *Reeson A.F. et al.* Insect Mol. Biol., 2003, 12. P. 85–91. [2] *Mohr K.I. and Tebbe C.C.* Environ. Microbiol., 2006, 8. P. 258–272. [3] *Thimm T. and Tebbe C.C.* Appl. Environ. Microbiol., 2003, 69. P. 2875–2878. [4] *Widmer, F. et al.* Journal of Microbiological Methods, 2006, 66(3). P. 512–520. [5] *Падумов В.Е. и др.* Методы молекулярно-генетического анализа / Минск: Юнипол, 2007. 176 с. [6] *Srivastava S. et al.* Bioinformation, 2008, 3(4). P. 173–176.

БЛАГОДАРНОСТИ. Работа была частично поддержана грантом БРФФИ Б20Р-175.