



Олег Баранов,
завлабораторией
геномных исследований
и биоинформатики
Института леса НАН Беларуси,
член-корреспондент



Станислав Пантелеев,
ведущий научный
сотрудник лаборатории
геномных исследований
и биоинформатики Института
леса НАН Беларуси, кандидат
биологических наук



Любовь Иващенко,
магистрант кафедры
лесозащиты
и древесиноведения
Белорусского
государственного
технологического
университета



Леса – важнейшее природное богатство Беларуси. Занимая порядка 40% всей территории страны, они представляют собой не только важную составляющую хозяйственной деятельности, но также выполняют широкий спектр экологических и социальных функций. Исходя из этого, главной целью ведения лесного хозяйства в нашей стране является рациональное управление имеющимися ресурсами и их воспроизводство, что обеспечивает сохранение их биоразнообразия, повышение биологической продуктивности и устойчивости. В последнее время все большее внимание уделяется применению экосистемных методов и подходов, основанных на рассмотрении лесных ценозов как совокупности взаимодействующих систем, представленных различными группами живых организмов. Среди всех взаимодействующих групп лесных видов особое место занимает система «древесные растения – микроорганизмы». Исходя из разнородности экологических признаков тип их взаимо-



МЕТАГЕНОМНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ЛЕСНЫХ ВИДОВ В БЕЛАРУСИ

отношений может быть прямым или опосредованным и представлен различными формами симбиоза, антибиоза, хищничества (применительно к некротрофным видам микроорганизмов) и нейтрализма. Изучение генетических аспектов взаимодействия в данной системе имеет как научную значимость (для решения различных фундаментальных вопросов физиологии, таксономии, систематики, экологии), так и практическую ценность – для восстановления, селекции и защиты леса.

Оценка результатов молекулярно-генетического анализа сообществ микроорганизмов в зависимости от типа решаемых задач может быть выполнена с использованием различных подходов, основные из которых – редукционистский (предусматривает расчленение суммарных данных о видах на составные части и их дальнейший анализ) и холистический (основан на рассмотрении метагенома сообщества как единого целого). Ведущую роль во втором подходе играют методы кластерного анализа, анализа микробиомов в таксономическом пространстве и др.

Микробиомы описываются с помощью отдельных ДНК-маркеров (метагенетический анализ), а также компилированных геномов (метагеномный анализ). При этом следует отметить, что полная или фрагментарная сборка геномов микроорганизмов при секвенировании их сообществ зачастую сопряжена с высокой вероятностью получения химерных последовательностей, включающих генетический материал различных видов и генотипов. Кроме того, одним из методологических аспектов высокопроизводительного секвенирования, отмечаемым на стадии создания и амплификации ДНК-библиотек, является эффект «бутылочного горлышка» для исходных матриц, что, как правило, затрудняет последующую точную количественную оценку входящих в сообщество видов микроорганизмов. Вследствие вышеуказанных особенностей для описания микробиоценозов нами используется сравнительный анализ первичного (неассемблированного) пула генетических данных, получаемого при секвенировании. Следует добавить, что его постоянное совершенствование, направленное на увеличение длины

прочтения ДНК-матриц, делает данную стратегию анализа, на наш взгляд, наиболее перспективной. Диагностируемые в общем пуле генетических данных ДНК-маркеры могут отражать как таксономическую принадлежность последовательностей (баркодинговые локусы, гены «домашнего хозяйства» и др.), так и свидетельствовать о функциональной (метаболической) значимости кодируемых ими белков, формирующих в целом общую систему метаболизма ассоциации. Недостаток данного подхода – значительный массив данных (от 500 тыс. и более последовательностей), требующих проведения функциональной аннотации.

Второй применяемый нами подход к анализу состава и структуры микробиомов базируется на использовании баркодинговых маркеров, характеризующихся специфическими размерами продуктов амплификации или рестрикции для разных видов микроорганизмов. Получаемые электрофоретические профили (с учетом их качественных и количественных параметров) микробных сообществ являются своеобразным «молекулярным паспортом», отражающим их структурные и функциональные характеристики (рис. 1).

Из-за отсутствия в базах данных и определителях (представленных на различных интернет-ресурсах в открытом доступе) видового описания для значительного числа микроорганизмов их обозначение может проводиться не на основании применения бинарного таксономического названия, а с использованием значения молекулярного размера маркерных регионов. Кроме того, описываемые генотипы микробиоты могут приравниваться не к отдельным видам, а к операционным таксономическим единицам (ОТЕ), которые в свою очередь способны объединять как близкородственные виды, так

и видовые комплексы, не обладающие дискретными молекулярно-генетическими различиями по имеющемуся перечню ДНК-маркеров.

Среди основных направлений метагеномных исследований лесных видов можно выделить следующие: фитопатологическое – связанное с диагностикой возбудителей заболеваний древесных растений, а также селекционным отбором форм деревьев с повышенной резистентностью к различным типам болезней; биотехнологическое – направленное на оптимизацию видовой структуры микробиоты корневых систем и ризосферы растений, что обеспечивает повышение их биологической продуктивности и устойчивости к воздействию различных негативных абиотических и биотических факторов среды.

В диагностике возбудителей фитозаболеваний важен не только непосредственный анализ пораженных растений, но и выявление потенциальных источников инфекции: почвы, воды (используемой для полива), насекомых (как основного вектора распространения трансмиссивных заболеваний) и др. Не менее значима и оценка эффективности профилактических и защитных мероприятий.

В ходе широкомасштабного молекулярно-фитопатологического обследования лесных питомников, лесных культур и древостоев, расположенных на территориях 62 лесохозяйственных учреждений Минлесхоза, НАН Беларуси, Минобразования, установлено, что в большинстве (>90%) образцов инфицированных растительных тканей были диагностированы мультиспецифические спектры микроорганизмов, в основном представленные патогенными грибами. Несмотря на комплексный характер инфекции, наибольшим количеством обычно характеризовался

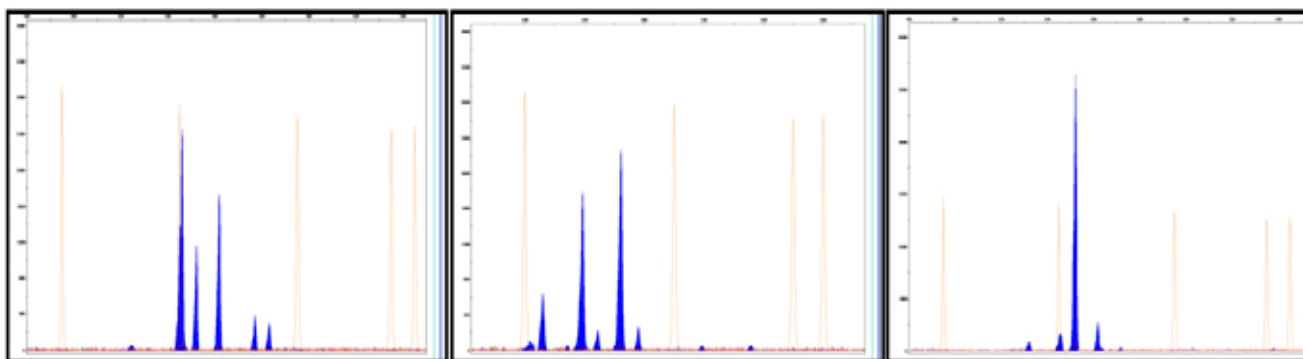


Рис. 1. Электрофоретические спектры микробиомов образцов инфицированной хвои сеянцев сосны обыкновенной из разных лесных питомников (ДНК-маркер ITS1)

какой-либо один или несколько видов фитопатогенов. При этом доминирующие виды микроорганизмов могли диагностироваться как в составе сообществ, так и формировать моноинфекции, что указывает на их ведущую роль в патогенезе растений. В то же время большинство сопутствующих микроорганизмов встречалось зачастую нерегулярно и исключительно в составе сообществ, что позволяло по результатам обследования относить их к группам вторичных патогенов и сапротрофов. Исходя из полученных результатов молекулярно-генетического анализа инфицированных тканей, нами была разработана тест-система для экспресс-диагностики смешанных инфекций лесных древесных растений, основанная на использовании универсальных праймеров, позволяющих идентифицировать одновременно генетический материал широкого спектра видов грибов и бактерий (рис. 2). При этом для каждой древесной породы и типа болезней (семян и плодов, сеянцев, побегов, ветвей и стволов и др.) разработан молекулярно-генетический определитель (более 200 таксонов), способный распознавать фитопатогенные организмы с высоким уровнем точности. Также следует отметить, что деплеция внеклеточной ДНК на стадии пробоподготовки или проведение диагностики на основе РНК-матриц, кроме видовой идентификации, позволяет установить и физиологический статус фитопатогенов.

Аналогичные подходы применяются нами и при анализе потенциальных источников инфекции. Однако значительное разнообразие микроорганизмов в объектах окружающей среды не всегда позволяет определить возбудителей заболеваний, имеющих наибольшую хозяйственную значимость. Так, например, анализ почвенного субстрата из ризосферы сеянцев сосны, инфицированных *Pyonectria* sp. (корневая гниль), показал, что долевое участие фитопатогена в микробиоме не превышало 5%. Еще одним примером являются результаты изучения доминирующих групп микромицетов в микробиомах насекомых-консортотов лиственных пород. Установлено, что большинство из них – условные паразиты (или симбионты)

насекомых (*Nakazawaea wyomingensis*, *Candida oregonensis* и др.) или некротрофные фитопатогенные виды (*Cladosporium* spp., *Alternaria* spp., *Phoma* spp., *Epicoccum* spp. и др.), способные инфицировать широкий спектр растительных организмов. В то же время в микробиомах ксилофагов (и энтомофагов, обитающих под корой), как правило, преобладали различные виды дроворазрушающих грибов, или фитопатогены, вызывающие сосудистые микозы (*Ophiostoma* spp., *Ceratocystis* spp. и др.). В целом в микробиомах насекомых среди видов с низким уровнем (<5%) представленности было идентифицировано более 200 видов микромицетов, способных проявлять фитопатогенные свойства (*Phomopsis* spp., *Didymella* spp., *Erysiphe* spp. и др.).

Оценка эффективности защитных мероприятий основана на сравнительном анализе структуры микробиомов до и после проведения обработок химическими препаратами или выполнения агротехнических уходов. Кроме того, ежегодный мониторинг микробных сообществ растений и объектов окружающей среды в различных лесных объектах позволяет определить основные неблагоприятные факторы, оказывающие влияние на их фитосанитарное состояние.

Еще одно направление в исследовании сообществ микроорганизмов и установлении молекулярных механизмов их взаимодействия с древесными растениями – метатранскриптомный анализ. В отличие от метагеномного, он дает возможность не только изучать микробное разнообразие и его функциональный потенциал, но и осуществлять



Рис. 2. Тест-система для экспресс-диагностики смешанных инфекций лесных древесных растений

молекулярно-генетическую оценку доминирующих патофизиологических процессов, включая определение уровня транскрипции генов патогенности (*pat*) и вирулентности (*vir*) фитопатогенов, а также генов резистентности (*r*) и патогенез-ассоциированных генов (*pr*) древесных растений.

В качестве примера можно привести метатранскриптомный анализ всходов сосны обыкновенной с признаками инфекционного полегания, по результатам которого установлено, что наряду с широко описываемыми в литературе микромицетами *Fusarium spp.*, *Aureobasidium spp.*, *Rhizoctonia spp.*, *Cladosporium spp.*, *Botrytis spp.*, *Alternaria spp.*, *Phoma spp.* у пораженных растений выявлялись и различные виды *Pseudomonas* (рис. 3). Кроме указанных родов, в меньшем количестве в патосистеме диагностированы эукариотические (*Pythium spp.*, *Periglandula spp.*, *Chaetomium spp.*, *Cryptococcus spp.* и др.) и прокариотические (*Cellvibrio spp.*, *Arthrobacter spp.*, *Flavobacterium spp.*) микроорганизмы. Общее количество идентифицированных в ходе исследования видовых таксонов составило порядка 14,5 тыс. ед. Однако для большинства из них доле участие в микробиоме не превысило 0,1%. По результатам аннотации факторов вирулентности и патогенности микромицетов диагностированы транскрипты белков семейств KSA, NSP, SNOG037, SNOG0557 и др., бактерий T3SS, PHOP, FLES и др. Применительно к сеянцам сосны обыкновенной в патосистеме выявлены транскрипты генов белков семейств CaM, HSP40s, HSP70, HSP90, LRR-RLK, PR-1, PR-4, SS/AF, LEA3, PR-3, PR-5, PR-9, PR-10 и др., участвующих в формировании защитного ответа при инфицировании.



Рис. 3. Формирование очага инфекционного полегания сеянцев сосны

На основе анализа транскрипционной активности, структурно-функциональных особенностей и полиморфизма данных генов разработана тест-система и проведен селекционный отбор в лесных питомниках учреждений Минлесхоза сеянцев сосны обыкновенной, с использованием которых создан объект опытных лесных культур с повышенной устойчивостью к фитозаболеванию – инфекционному полеганию сеянцев.

Среди биотехнологических аспектов метатранскриптомного анализа наиболее значимо изучение видовой структуры микориз и микробиомов ризосферы растений для последующей разработки биопрепаратов ростостимулирующего и защитного действия, применение которых обеспечивает повышение эффективности выращивания лесного посадочного материала и проведения работ по лесовосстановлению и лесоразведению, а также снижение трудовых и финансовых затрат при выполнении данных мероприятий.

Одна из особенностей формирования микориз лесообразующих древесных растений – наличие сукцессии микробиоты, то есть на различных стадиях онтогенеза в качестве грибного компонента микориз могут выступать различные группы микро- и макромицетов. Так, в возрасте 1–3 лет в корневых окончаниях, как правило, доминируют различные виды аскомицетов и дейтеромицетов. В последующем происходит постепенная трансформация микробиома с увеличением долевого участия базидиомицетов. Несмотря на то, что ассоциации микоризообразующих грибов с корнями растений широко распространены в природе, проведенный нами анализ посадочного материала в лесных питомниках показал,

что видовая структура микориз, образуемых естественным путем, в основном представлена условно-патогенными грибами (*Wilcoxina spp.*, *Trichoderma spp.*, *Meliniomyces spp.*, *Thelephora spp.* и др.), которые в случаях ослабления растений (например, в условиях абиотического стресса) оказывали на них отрицательное воздействие, выступая уже в качестве факультативных паразитов.

Исходя из полученных результатов, нами была разработана стратегия отбора микроорганизмов, направленная

на поиск видовых ассоциаций и комплексов, которые наряду со стимулирующим действием не способны вызывать инфекционное поражение растений при различных негативных флуктуациях факторов среды. Для реализации данной стратегии в рамках ГП «Научно-инновационная деятельность Национальной академии наук Беларуси» начаты исследования по метагеномному анализу микориз в лесных культурах (леса искусственного происхождения) для последующей разработки биопрепаратов на основе высокоактивных штаммов почвенных грибов. Актуальность данных работ связана не только с востребованностью лесохозяйственными учреждениями страны данных типов препаратов, но и с выраженным экспортным потенциалом их производства. Анализ перечня существующих на мировом рынке биопрепаратов, содержащих симбиотические грибы, показал, что их действие не является универсальным для большого числа растений. Значительная часть составов ориентирована на применение в сельском хозяйстве при выращивании зерновых и бобовых культур. Указанные препараты создаются на основе грибов рода *Glomus*, образующих везикулярно-арбускулярную микоризу (эндомикоризу), не имеющих применения в практике микоризации при выращивании лесного посадочного материала. Среди микоризообразующих препаратов лесных пород перспективны комплексные составы, включающие не только грибной компонент, но и бактериальный, оказывающий стимулирующее действие на процессы микоризообразования (*mycorrhiza helper bacteria* (МНВ)). Использование метагеномного подхода позволяет разработать полифункциональные микоризные инокулянты нового поколения, формирующие стабильный многокомпонентный экто- и эндосимбиоз почвенных грибов с корневыми системами сеянцев и саженцев хвойных пород на различных этапах их выращивания.

Среди проведенных метагеномных исследований микориз лесных видов следует отметить совместную работу Института леса с Полесским государственным университетом, связанную с анализом микробиомов корневых окончаний голубики высокорослой и черники обыкновенной. В результате молекулярно-генетического анализа идентифицирован широкий спектр видов грибов, относящихся к родам *Botryosphaeria*, *Chaetomium*, *Cylindrocarpon*, *Gaeumannomyces*, *Lachnum*, *Leptosphaeria*, *Neonectria*, *Oidiodendron*, *Pezicula*, *Phialocephala*, *Phomopsis*, *Trichoderma*,

Umbelopsis. В большинстве случаев в составе метагенома каждого из проанализированных образцов корневых окончаний преобладали 4–6 (с долевым участием в сообществе >5%) ОТЕ микромицетов. Количество детектируемых сопутствующих ($P_i < 5\%$) или находящихся в следовом количестве ($P_i < 0,1\%$) ОТЕ для разных образцов варьировало в существенной степени – 3–22. В ходе последующих микробиологических работ были получены изоляты двух видов микромицетов: *Phialocephala fortinii* и *Pezicula* sp., доминирующих в микобиомах *V. corymbosum* и *V. myrtillus* соответственно. При проведении повторной биотизации асептических культур голубики и черники биопрепаратами на основе выделенных изолятов повторно получены микоризы с верифицированным содержанием *Phialocephala fortinii* и *Pezicula* sp.

Последующее развитие метагеномных исследований лесных видов предусматривает разработку новых подходов к анализу патосистем, включающих их функциональную оценку, а также выявление молекулярных маркеров формирования очагов инфекций. Согласно нашим исследованиям и данным литературы, экологические характеристики штаммов и видов зачастую имеют генетическую природу, что выражается в наследовании патогенных (в случае с растениями), антагонистических, конкурентных и синтрофных (по отношению к другим микроорганизмам) свойств. Процессы трансформации сообществ фитопатогенных микроорганизмов, как правило, направлены на структурные преобразования не конкретных таксономических единиц, а общего метаболизма сообщества. Исходя из этого для описания свойств микробиомов и функциональной оценки метаболомов фитопатогенных микроорганизмов, на наш взгляд, наиболее перспективен анализ совокупной структуры и изменчивости локусов, детерминирующих факторы патогенности и вирулентности. Это подтверждается тем, что большинство фитопатогенных микроорганизмов и их сообществ могут быть сгруппированы на основании перечня генов, детерминирующих тот или иной тип патогенетических процессов, что может являться молекулярно-фитопатологическим признаком данных патосистем. ■