

УДК 577.212:632.4

**МИКОБИОТА *IPS SEXDENTATUS* (BÖRNER, 1776)  
(COLEOPTERA, CURCULIONIDAE: SCOLYTINAE)  
НА ТЕРРИТОРИИ БЕЛАРУСИ**

© 2023 г. М. О. Романенко,<sup>1\*</sup> С. В. Пантелеев,<sup>2\*\*</sup> А. А. Сазонов,<sup>3\*\*\*</sup>  
Л. О. Иващенко<sup>4\*\*\*\*</sup>

<sup>1</sup> Latvian State Forest Research Institute «Silava»  
111 Rigas str., Salaspils, LV-2169 Latvia

<sup>2</sup> Институт леса НАН Беларуси

ул. Пролетарская, 71, Гомель, 246001 Республика Беларусь

<sup>3</sup> Лесостроительное республиканское унитарное предприятие «Белгослес»

Министерства лесного хозяйства Республики Беларусь  
ул. Железнодорожная, 27/1, Минск, 220089 Республика Беларусь

<sup>4</sup> Белорусский государственный технологический университет  
ул. Свердлова, 13а, Минск, 220006 Республика Беларусь

\*e-mail: maryna.ramanenka@silava.lv (автор для переписки), \*\*e-mail: stasikdesu@mail.ru,

\*\*\*e-mail: lesopatolog@rambler.ru, \*\*\*\*e-mail: lyba281997@mail.ru

Поступила в редакцию 31.12.2022 г.

После доработки 15.08.2023 г.

Принята к публикации 15.08.2023 г.

В работе приведены результаты исследования грибного компонента микробиома, ассоциированного с короедом-стенографом (*Ips sexdentatus*) на территории Беларуси, для уточнения роли этого ксилофага как вектора опасных фитопатогенных грибов. Проанализировано культурально-морфологическим и молекулярно-генетическим методами более 360 чистых культур грибов, выделенных с поверхности и из гемоцеля *Ips sexdentatus*, в которых идентифицировано 35 видов грибов из 25 родов 17 семейств 3 отделов.

Все виды по характеру наносимого ими ущерба лесной и деревообрабатывающей промышленности условно разделены на три группы: 1) деревоокрашивающие грибы, 2) грибы, вызывающие гнили растущего леса и заготовленной древесины, и 3) грибы, роль которых в повреждении заготовленной древесины неясна. Выявлено 5 видов грибов из сем. Ophiostomataceae, связанных с синевой древесины: *Leptographium* Lagerb. & Melin sp., *Ophiostoma ips* (Rumbold) Nannf., *O. minus* (Hedgc.) Syd. & P. Syd., *O. canum* (Münch) Syd. & P. Syd. и *O. piceae* (Münch) Syd. & P. Syd.. Возбудитель корневой губки сосновых насаждений, гриб *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref., найден в 7.8 % проб микробиоты. Высокая частота встречаемости короеда-стенографа подтверждает его участие в формировании комплексных очагов усыхания сосны на территории Беларуси.

С применением молекулярно-генетического метода зафиксирована 11.4%-ная зараженность популяции *I. sexdentatus* четырьмя энтомопатогенными грибами.

*Ключевые слова:* *Ips sexdentatus*, *Pinus sylvestris*, энтомопатогенные грибы, видовое разнообразие.

**DOI:** 10.31857/S036714452303005X, **EDN:** XORORU

По ряду ключевых показателей, характеризующих лесной фонд (лесистость территории, площадь лесов и запас растущей древесины в пересчете на одного жителя), Беларусь входит в первую десятку лесных государств Европы (Лесной фонд..., 2022). 40.1 % территории лесов приходится на сосну обыкновенную (*Pinus sylvestris*). В последнее десятилетие в сосновых насаждениях республики начали наблюдаться массовые патологические явления, и к концу 2021 г. площадь усыхающих сосновых лесов в стране составляла 144 530 га, или 3.9 % от площади всех сосновых лесов Беларуси.

К основным причинам ослабления сосновых насаждений наряду с поражением сосновой корневой губкой (*Heterobasidion annosum*) относится повреждение древостоев стволовыми вредителями – короедное усыхание сосны (доминирующие виды: вершинный короед – *Ips acuminatus* Gyll., и короед-стенограф, или шестизубый короед – *I. sexdentatus* (Börner, 1776)) (Обзор лесопатологического..., 2022).

На территории Беларуси ранее не проводилось изучение энтомохорных микрокомплексов, связанных с ксилофагами сосны, вызывающими массовое усыхание сосновых насаждений. Первым этапом нашего изучения грибной флоры энтомопатогенного комплекса сосновых насаждений стало исследование грибного микробиома шестизубого короеда.

Стенограф часто формирует комплексные очаги совместно с вершинным короедом и сосновой корневой губкой (рис. 1) (Машнина, 1963; Душин, 1981; Сазонов и др., 2017; (Обзор лесопатологического..., 2022). В Беларуси к началу 2019 г. площадь выявленных сосновых насаждений с такими комплексными очагами составляла 5.7 тыс. га (Защита леса от вредителей и болезней..., 2022), а за период 2016–2021 гг. сосновые древостои были повреждены стволовыми вредителями на площади 826.1 тыс. га, что потребовало проведения санитарно-оздоровительных мероприятий с объемом вырубленной древесины 38.1 млн. м<sup>3</sup>.

Шестизубый короед – палеарктический ксилофаг, распространенный по всей Европе (рис. 2) (Старк, 1952; Мозолевская и др., 2010; Lopez, Goldarazena, 2012; Alonso-Zarazaga et al., 2017; Jeger et al., 2017), самый крупный короед из встречающихся на сосне в Беларуси (Александрович и др., 1996). От всех остальных видов рода *Ips* он отличается крупными размерами (длина тела 6–8 мм) и числом зубцов по краям впадины на вершинном скате надкрылий. Маточные ходы короеда (рис. 3) также довольно примечательны: достигают 40 см в длину и 3–4 мм в ширину и прорезываются как в толстой, так и в тонкой коре.



Рис. 1. Комплексный очаг усыхания сосны. Фото М. О. Романенко.

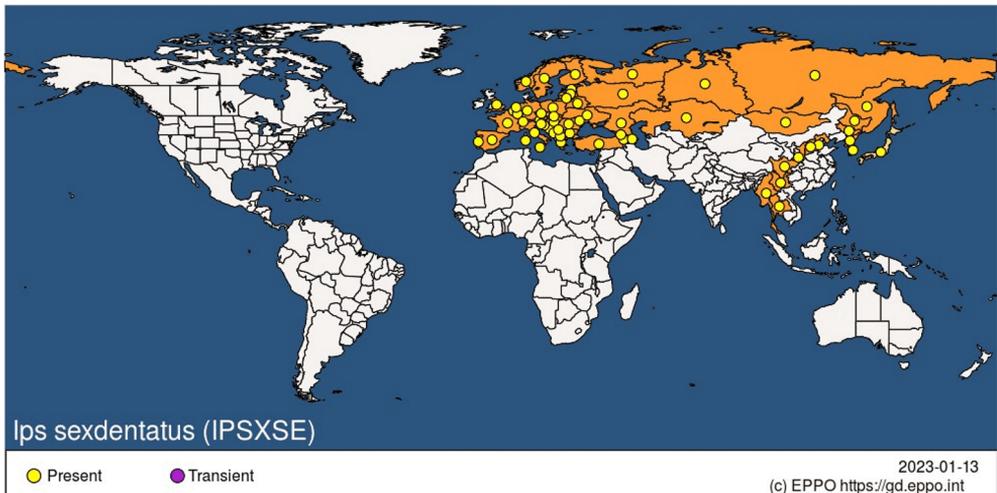


Рис. 2. Карта распространения *Ips sexdentatus* (Börner) на основе международной базы данных EPPO, август 2017 г. (по: Jeger et al., 2017).



**Рис. 3.** Ходы *Ips sexdentatus* (Börner) под корой сосны. Фото М. О. Романенко.

Лёт жуков начинается в апреле–мае и в годы с высокими летними температурами может продолжаться до сентября (Jactel, Gaillard, 1991; Lopez, Goldarazena, 2012). За сутки стенограф может пролететь расстояние от 5 до 45 км со скоростью 1.3 м/с (Lopez, Goldarazena, 2012).

Основные растения-хозяева стенографа – различные виды сосен (*Pinus sylvestris*, *P. pinaster* Aiton, *P. radiata* D. Don, *P. leucodermis* Antoine, *P. nigra* J. F. Arnold), но он может заселять также ели (*Picea abies* (L.) H. Karst., *P. ajanensis* Lindl. et Gordon), пихты (*Abies alba* Mill., *A. nordmanniana* (Steven) Spach, *A. sibirica* Ledeb., *A. holophylla* Maxim., *A. nephrolepis* (Trautv. ex Maxim.) Maxim., *A. sachalinensis* F. Schmidt) и лист-



а



б

**Рис. 4.**

а – молодые жуки *Ips sexdentatus* (Börner) на древесине сосны и распространяющаяся по заболони синева, б – синева древесины на торце лесоматериалов. Фото А. А. Сазонова.

венницы (*Larix decidua* Mill., *L. sibirica* Ledeb., *L. gmelinii* Rupr., *L. olgensis* A. Henry) (Старк, 1952; Jeger et al., 2017; European Environment Agency, 2022).

В Беларуси *I. sexdentatus* формирует ежегодно две полных генерации. Жук выступает в качестве переносчика патогенов растений. Поселяясь совместно с *I. acuminatus* (Gyllenhal, 1827) на ослабленных, а иногда и внешне здоровых деревьях, он заносит под кору грибную и бактериальную инфекции, вызывающие изменение окраски заболонной древесины (рис. 4, а, б).

Описано более 30 видов офиостоматоидных грибов, переносимых этим короедом (Davidson, 1955; Bueno, 2010; Linnakoski et al., 2010; Jankowiak, 2012; Aas et al., 2018; Davydenko et al., 2021). Число видов грибов родов *Ophiostoma* и *Leptographium*, для которых установлена ассоциация со стенографом, каждый год растет с развитием молекулярно-генетических методов. Вирулентность выделенных офиостоматоидных грибов различная, однако все они вызывают дискolorизацию древесины (синеву и другие заболонные окраски) даже при искусственной инокуляции срубленного дерева (Davydenko et al., 2021). Информация о других патогенных грибах, входящих в микробиом *I. sexdentatus*, зачастую отсутствует, так как обычно регистрируется ущерб, причиненный исключительно офиостоматоидными грибами.

Цель данной работы – изучение грибного компонента микробиома короеда-стенографа в Беларуси.

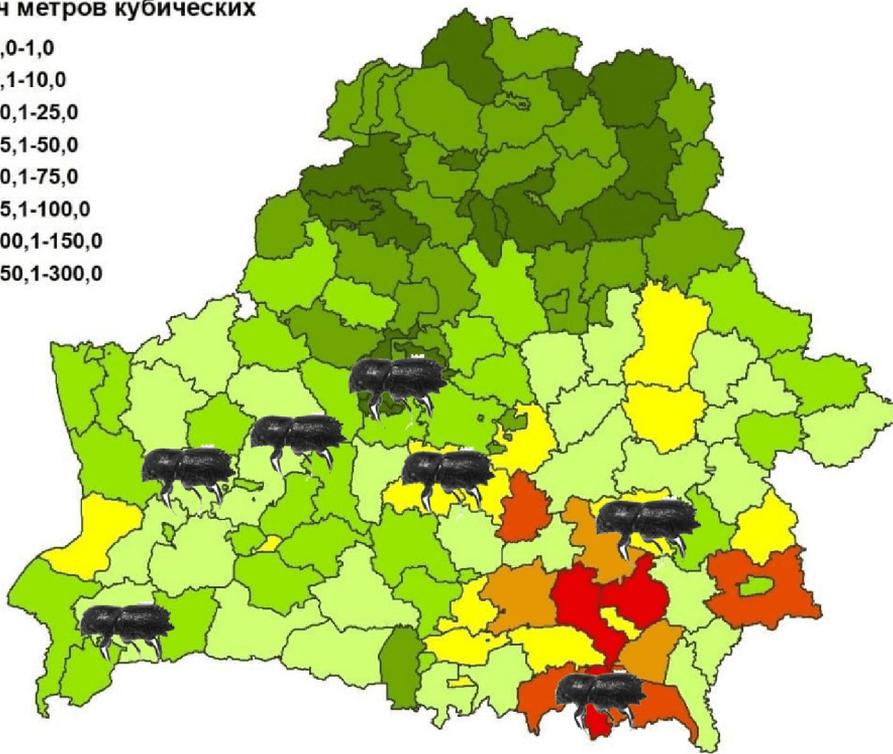
#### МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

В течение полевого сезона 2020–2021 гг. для изучения грибов, переносимых шестизубым короедом, нами был произведен сбор имаго первого поколения *I. sexdentatus* из маточных ходов с деревьев IV и V категорий в очагах усыхания сосновых насаждений на территории 7 лесохозяйственных учреждений: Узденский, Лельчицкий, Жлобинский, Слонимский, Барановичский, Кобринский опытный и Негорельский учебно-опытный лесхозы. Схема расположения объектов приведена на рис. 5. Очаги усыхания в соответствии с Санитарными правилами в лесах Республики Беларусь (Об утверждении Санитарных правил..., 2016) и ТКП 634–2019 (Порядок проведения лесозащитных мероприятий в лесах..., 2019) относились к действующим очагам корневой губки со слабой степенью поражения. Популяционные показатели короеда не рассчитывались, так как это не входило в задачи исследования.

В каждом из лесохозяйственных учреждений жуков собирали и помещали по отдельности в стерильные пробирки типа Eppendorf объемом 1.5 мл, маркировали и транспортировали в лабораторию. Особей для дальнейшего выделения и культивирования грибов хранили при температуре 4 °C не более трех дней. Часть собранных жуков хранили при температуре –20 °C в ультранизкотемпературном морозильнике Arctiko ULTF 220 для проведения дальнейшего молекулярно-генетического анализа. Длительное хранение идентифицированных чистых культур происходит в термостате с охлаждением Memmert IPP55 по настоящее время.

В лабораторных условиях жуков снаружи промывали стерильной дистиллированной водой и выкладывали на поверхность агаризованной питательной среды в чашки Петри (не растирая по поверхности чашки) с агаризованной сусло-средой или MEA без добавления антибиотиков (Билай, 1982; Davydenko et al., 2017). Инкубирование проводили при температуре 22 °C в хладотермостате ХТ-3.

**Объем усыхающих сосновых лесов,  
тысяч метров кубических**



**Рис. 5.** Места сбора *Ips sexdentatus* (Börner) в очагах усыхания сосновых насаждений на территории Беларуси.

Для поиска кишечных грибных симбионтов и их выделения из гемоцеля поверхность жуков стерилизовали 15%-ной перекисью водорода в течение 1 мин, промывали жуков стерильной водой, просушивали на чистой салфетке и затем выкладывали в чашку Петри на питательную среду с добавлением стрептомицина (0.025 г антибиотика на 250 мл среды) для предотвращения зарастания чашки бактериями. Все грибы, которые проросли, считали перенесенными внутри гемоцеля, так как споры офиостоматоидных грибов, которые переносят жуки, расположены на поверхности экзоскелета и сильная поверхностная стерилизация удаляет их.

Чашки Петри проверяли ежедневно в течение трех недель, при появлении типичного мицелия грибы субкультивировали в новых чашках Петри со свежей средой. Идентификацию грибов и изучение их видового таксономического разнообразия проводили при наличии четко сформированного конидиального спороношения с использованием микроскопов проходящего и отраженного света (Olympus, Leica DMLB) и классических определительных таблиц (Nobles, 1965; Barnett, Hunter, 1972; Alexopoulos et al., 1996; Watanabe, 2002). Систематическая принадлежность грибов определена с помощью базы данных Index fungorum (<http://www.indexfungorum.org/>).

ДНК из мицелия грибов экстрагировали с применением СТАВ-метода (Падутов и др., 2007). Основные требования, предъявляемыми к методике: 1) получение препаратов нуклеиновых кислот с размером фрагментов более 20 тыс. п. н.; 2) отсутствие деградации ДНК и ингибиторов

полимеразной цепной реакции (ПЦР) (показатели A260/A280 и A260/A230 более 1.8) (Gardes, Bruns, 1993; Glasel, 1995; Tataurov et al., 2008).

Для проведения полимеразной цепной реакции использовался набор ArtMix Форез 2× (АртБиоТех, РБ) согласно инструкции фирмы-производителя. В качестве маркерного региона для видовой идентификации грибов был выбран фрагмент рДНК: 18S рДНК-ITS1-5.8S рДНК-ITS2-28SpДНК. С целью амплификации данного локуса использовались праймеры ITS1F/ITS4 (White et al., 1990; Gardes, Bruns, 1993). Режим амплификации был следующим: денатурация (95 °С, 3 мин) – 1 цикл; денатурация (95 °С, 20 сек), отжиг (55 °С, 20 сек), элонгация (72 °С, 45 сек) – 35 циклов; охлаждение реакционной смеси (4 °С).

Электрофоретическое фракционирование продуктов ПЦР проводилось в 1.5%-ном агарозном геле с использованием 1 × TBE буфера в соответствии с инструкцией производителя. Визуализированные ампликоны очищали набором AMPure XP (Beckman Coulter, США) в соответствии с инструкцией.

Для секвенирования использовали метод терминации цепи, или метод Сэнгера (Sanger et al., 1977), основанный на применении дидеоксинуклеозидтрифосфатов. Секвенирующую реакцию проводили с использованием буферного реагента BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific, США). Температурный профиль секвенирующей реакции в термоциклере был следующим: денатурация (96 °С, 1 мин) – 1 цикл; денатурация (96 °С, 10 сек); отжиг (50 °С, 5 сек); элонгация (60 °С, 3 мин) – 40 циклов; охлаждение реакционной смеси (4 °С). Электрофоретический анализ и детекция меченых продуктов проводились в генетическом анализаторе ABI Prism 310. Количество внесенного образца составляло 30 мкл. Использовали денатурирующий гель POP-4™ и протокол быстрого секвенирования (28 мин. на образец) – P4StdSeq (1ml) E.md4. Результаты интерпретировали с помощью специального программного обеспечения Sequencing Analysis Software 5.1.1 и базы данных NCBI BLAST (National Center for Biotechnological Information, 1922).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В 2020–2022 гг. нами было исследовано 230 особей шестизубого короэда, из которых выделено более 360 чистых культур грибов. Частота встречаемости грибного материала составляла 65.3 %, в остальных случаях питательная среда в чашке Петри обильно зарастала бактериями, и такие варианты опыта отбраковывались.

Для описания относительной встречаемости все виды грибов условно разделили на группы: виды, которые встречаются эпизодично – частота встречаемости до 1 %; редко – частота встречаемости от 1.1 до 2.0 %; наиболее обычные виды грибов в микробиоме – 2.1 % и более. В рамках данной работы нами было зарегистрировано 35 видов грибов, биологический материал которых присутствовал на экзоскелете или в гемоцеле шестизубого короэда (табл. 1).

В ходе ПЦР-анализа для выявления в тканях насекомых грибной ДНК был получен электрофоретический спектр ампликонов, характеризующийся наличием ряда фракций различной интенсивности. В жуках *I. sexdentatus* можно различать одновременно доминирующие и несколько сопутствующих видов, общее число переносимых видов грибов в имаго (комплексная микофлора) варьирует от 3 до 9. Альтернативные доминирующие варианты ампликонов были отобраны для проведения секвенирующей реакции.

В качестве сравнения отметим, что в состав микобиома стенографа и древесины из его ходов, который описан К. Давыденко (Davydenko et al., 2021), входит 56 видов грибов (6 из них не описаны в базе данных NCBI BLAST) из 39 родов. 16 видов грибов (28 %) – общие для территорий Беларуси и Украины.

Среди выделенных грибов есть космополитные виды, встречающиеся на широком круге субстратов (гниющих растительных и животных остатках, древесине, в почве) (Barnett, Hunter, 1972; Watanabe, 2002). Часто из короедов выделяются грибы из родов *Alternaria*, *Cladosporium*, *Botrytis* и *Fusarium*, способные как к сапрофитному развитию на растительных остатках, так и к активному поражению древесных и кустарниковых растений. Эти же грибы вызывают и поверхностное плесневение заготовленных лесоматериалов (Федоров, 2004; Agrios, 2005; Dean et al., 2012). Многие выделенные виды, например, из родов *Phoma* и *Epicoccum*, условно патогенны для деревьев и в основном встречаются как эндофиты.

Сапрофитные грибы, такие как *Trichoderma*, *Penicillium*, *Umbelopsis isabellina* и *Mucor mucedo*, также были зарегистрированы в ряде исследований (Linnakoski, 2011; Davydenko et al., 2021) шестизубого короеда и другихксилофагов сосны.

Выделены и идентифицированы 3 вида грибов из отдела Basidiomycota, два из которых вызывают стволовые и корневые гнили растущих деревьев хвойных пород. Выделение из стенографа возбудителя корневой губки, гриба *Heterobasidion annosum*, подтверждает его участие в формировании комплексных очагов усыхания сосны на территории Беларуси и способность переносить этот опаснейший патоген сосны. Ранее в подобных исследованиях гриб *H. annosum* уже регистрировался как один из постоянных ассоциантов короедов (Persson et al., 2009; Davydenko et al., 2017, 2021).

Диагностирована чистая культура гриба *Coniophora puteana*, который является серьезным деструктором заготовленной древесины (и в редких случаях способен переселяться на ослабленные живые деревья) (Федоров, 2004). Этот гриб на ослабленных деревьях часто приводит к развитию скрытой гнили, вызывающей гибель дерева, после чего и начинается рост базидиом (*Bernicchia*, Gorjon, 2010). Встречаемость данного вида незначительная – 1.7 %.

Микофлора включает 4 вида энтомопатогенных грибов (11.4 % от всей выделенной микобиоты), вызывающих болезни и гибель особей короеда: *Akanthomyces muscarius*, *Beauveria bassiana*, *Cephalosporium muscarium* и *Purpureocillium takamizusanense*. Патогенность данных видов для короедов недостаточно изучена, за исключением *B. bassiana* (частота его встречаемости в микобиоме стенографа на территории Беларуси составляет 2.2 %). Гриб встречается также в микофлоре *I. acuminatus*, *I. typographus* и *Tomicus* spp. (Annala et al., 1999; Jankowiak, 2006, 2007; Davydenko et al., 2017, 2021), что еще раз доказывает его полигостальность (Burjanadze, 2010).

В результате изучения кишечных симбионтов с применением молекулярно-генетического метода выявлены амброзийные и дрожжевые грибы, которые составляют 8.5 % от общего числа всех выявленных видов, однако на наш взгляд их может быть

Таблица 1. Видовое разнообразие грибов, идентифицированных морфологическим и молекулярно-генетическим методами

Класс	Порядок	Семейство	Род	Вид	Метод идентификации	Частота встречаемости, %		
Sordariomycetes	Hypocreales	Cordycipitaceae	Отдел <b>Ascomycota</b>					
			<i>Akanthomyces</i> Lebert		<i>A. muscarius</i> (Petch) Spatafora, Kepler & B. Shrestha	Г	1.1	
			<i>Beauveria</i> (Bals.-Criv.) Vuill.		<i>B. bassiana</i> (Bals.-Criv.) Vuill.	М, Г	2.2	
			<i>Cephalosporium</i> Link		<i>C. muscarium</i> Petch	Г	0.8	
			<i>Purpureocillium</i> Luang-sa-ard, Hywel-Jones, Houbraken & Samson		<i>P. takamizusanense</i> (Kobayasi) S. Ban, Azuma & Hiroki Sato	Г	0.6	
			<i>Fusarium</i> Link		<i>F. solani</i> (Mart.) Sacc.	М, Г	4.7	
					<i>F. oxysporum</i> sensu Smith & Swingle	М	5.6	
					<i>Fusarium</i> sp.	М	1.7	
					<i>Sarocladium</i> * W. Gams & D. Hawksw.	Г	0.6	
					<i>Trichoderma</i> Bisset	М	12.8	
					<i>Clonostachys</i> Corda	М	3.6	
					<i>Leptographium</i> Lagerb. & Melin	Г	0.3	
					<i>Ophiosstoma</i> Syd. & P. Syd.	Г	1.4	
						М, Г	5.0	
						М, Г	4.2	
						М, Г	2.5	
			М, Г	3.3				

Eurotiomycetes	Eurotiales	Aspergillaceae	<i>Penicillium</i> Link	<i>P. bialowiezense</i> K. W. Zaleski <i>Penicillium</i> sp. <i>A. versicolor</i> (Vuill.) Tirab. <i>A. ochraceus</i> G. Wilh. <i>B. cinerea</i> Pers. <i>Botrytis</i> sp. <i>C. cladosporioides</i> (Fresen.) G. A. de Vries. <i>Cladosporium</i> sp. <i>E. nigrum</i> Link <i>Phoma</i> sp. <i>A. alternata</i> (Fr.) Keissl. <i>Sugiyamaella</i> sp.	Г М М М М М М М М Г	1.4 4.7 2.5 2.8 2.2 1.7 2.5
Leotiomycetes	Helotiales	Sclerotiniaceae	<i>Aspergillus</i> Micheli			
Dothideomycetes	Capnodiales	Cladosporiaceae	<i>Botrytis</i> P. Micheli ex Pers. <i>Cladosporium</i> Link			
	Pleosporales	Didymellaceae	<i>Epicoecum</i> Link <i>Phoma</i> Saccardo			3.1 3.3
Saccharomycetes	Saccharomycetales	Pleosporaceae Trichomonascaceae	<i>Alternaria</i> Nees <i>Sugiyamaella</i> Kurtzman & Robnett			2.5
		Incertae sedis	<i>Nakazawaea</i> * Y. Yamada, K. Maeda & Mikata		Г	1.4
		Incertae sedis	<i>Cyberlinidnera</i> * Minter		Г	0.8
<b>Отдел Basidiomycota</b>						
Agaricomycetes	Polyporales Russulales Boletales	Fomitopsidaceae Bondarzewiaceae Coniophoraceae	<i>Fomitopsis</i> P. Karst. <i>Heterobasidium</i> Bref. <i>Coniophora</i> DC.	<i>F. pinicola</i> (Sw.) P. Karst. <i>H. annosum</i> (Fr.) Bref. <i>C. puteana</i> (Schumach.) P. Karst.	М, Г М, Г Г	3.3 7.8 1.7
Mucoromycetes	Mucorales	Mucoraceae	<i>Mucor</i> Fresen.	<i>M. mucedo</i> de Bary & Woron.	М, Г	3.6
Umbelopsidomycetes	Umbelopsidales	Umbelopsidaceae	<i>Umbelopsis</i> Amos & H. L. Barnett	<i>U. isabellina</i> (Oudemans) W. Gams	М, Г	2.5
8	12	17	Всего 25 (положение 3 родов в системе неясно)	35	–	100.0

Пр и м ч а н и е. Incertae sedis – положение рода в системе неясно; методы идентификации: М – морфологический, Г – молекулярно-генетический.

значительно больше. Выделенные нами виды *Sugiyamaella* известны как ферментирующие ксилоту (Urbina et al., 2013; Cheng-Feng Shi et al., 2021). Сахаромицет *Nakazawaea ambrosiae* ранее был обнаружен в личиночных ходах и в личинках *I. typographus* и *Dendroctonus micans* на территории Московской обл. (Crous et al., 2019). Грибы рода *Cyberlindnera* – симбионтные дрожжи, присутствующие в кишечнике ксилофагов и играющие значительную роль в процессах детоксикации защитных химических веществ деревьев и разрушения лигнина древесины (Soto-Robles et al., 2019; Chakraborty et al., 2020). Изучение данной группы грибов затруднительно и требует разработки специализированных методов.

Таким образом, все идентифицированные грибы можно разделить на следующие группы по характеру наносимого ими ущерба лесной и деревообрабатывающей промышленности:

- 1) вызывающие дисколоризацию древесины (плесени и заболонные окраски);
- 2) вызывающие гнили заготовленной древесины и растущего леса;
- 3) виды, роль которых в повреждении заготовленной древесины неясна.

Часть микофлоры *I. sexdentatus* осталась не выявленной. Возможно, некоторые виды грибов не поддаются культивированию на питательных средах либо биотрофны, встречаются только в течение части сезона и только у особой определенных генераций короеда. Необходимо выяснение биологических особенностей и лесопатологического значения этих грибов.

Наше исследование микофлоры короеда *I. sexdentatus* с использованием методов ДНК-анализа – одно из первых в Беларуси. Работы в этом направлении планируется продолжить с другими вредителями, в том числе с использованием метогеномных методов анализа.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при частичной поддержке Белорусского Республиканского фонда фундаментальных исследований, договор № Б21М-041 от 01.07.2021 г.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Александрович О. Р. и др. 1996. Каталог жесткокрылых (Coleoptera, Insecta) Беларуси. Минск: ФФИ РБ, 103 с.
- Билай В. И. 1982. Методы экспериментальной микологии. Киев: Наукова думка, 552 с.
- Душин Н. Г. 1981. Стволовые вредители в ослабленных корневой губкой сосновых насаждениях БССР и пути ограничения их численности. Автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата сельскохозяйственных наук. Минская обл., пос. Самохваловичи: Белорусский ордена Трудового Красного Знамени технологический институт им. С. М. Кирова, 20 с.
- Защита леса от вредителей и болезней. [Официальный сайт Министерства лесного хозяйства Республики Беларусь, URL: <https://www.mlh.by/our-main-activites/safety-and-security/ot-vrediteley-i-bolezney/>] (дата обращения: 14.12.2022).
- Лесной фонд. [Официальный сайт Министерства лесного хозяйства Республики Беларусь, URL: <https://www.mlh.by/our-main-activites/forestry/forests/>] (дата обращения: 14.12.2022).

- Машнина Т. И. 1963. Стволовые вредители сосны в лесах Белорусской ССР и пути ограничения их численности. Автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук. Киев: Украинская ордена Трудового Красного Знамени сельскохозяйственная академия, 22 с.
- Мозолевская Е. Г. и др. 2010. Лесная энтомология. М.: Издательский центр «Академия», 415 с.
- Об утверждении Санитарных правил в лесах Республики Беларусь. Постановление Министерства лесного хозяйства Республики Беларусь от 19 декабря 2016 г. № 79. [Национальный правовой интернет-портал Республики Беларусь, URL: <https://pravo.by/document/?guid=3961&p0=W21631603>]
- Обзор лесопатологического и санитарного состояния лесного фонда Республики Беларусь за 2021 год и прогноз развития патологических процессов в 2022 году. 2022. Ждановичи: Министерство лесного хозяйства Республики Беларусь, Беллесозащита, 84 с.
- Падутов В. Е. и др. 2007. Методы молекулярно-генетического анализа. Минск: Юнипол, 176 с.
- Порядок проведения лесозащитных мероприятий в лесах. Постановление Минлесхоза № 11 от 22 марта 2019 г. [Национальный правовой Интернет-портал Республики Беларусь, URL: <https://pravo.by/document/?guid=3961&p0=W2163160>].
- Сазонов А. А. и др. [Интернет-документ] 2017. Ведение лесного хозяйства в условиях короedного усыхания сосны: практическое руководство №1 [URL: [https://elib.belstu.by/bitstream/123456789/27561/1/Sazonov\\_Vedenie%20lesnogo.pdf](https://elib.belstu.by/bitstream/123456789/27561/1/Sazonov_Vedenie%20lesnogo.pdf)].
- Старк В. Н. 1952. Фауна СССР. Жесткокрылые. Том XXXI. Короеды. М.; Л.: Издательство Академии наук СССР, 462 с.
- Федоров Н.И. 2004. Лесная фитопатология; Мн.: БГТУ, 462 с.
- Aas T. et al. 2018. Four new *Ophiostoma* species associated with hardwood-infesting bark beetles in Norway and Poland. *Fungal Biology* **122** (12): 1142–1158.  
<https://doi.org/10.1016/j.funbio.2018.08.001>
- Agrios G. N. 2005. *Plant Pathology*. 5th Edition. Elsevier Academic Press, 922 p.
- Alexopoulos C. J. et al. 1996. *Introductory Mycology*. 4th Edition. New York: John Wiley and Sons, 869 p.
- Alonso-Zarazaga M. A. et al. 2017. Cooperative catalogue of Palaearctic Coleoptera Curculionidea. *Monografias Electronicas SEA* **8** (1): 1–729.
- Annala E. et al. 1999. Susceptibility of defoliated Scots pine to spontaneous and induced attack by *Tomicus piniperda* and *Tomicus minor*. *Silva Fennica* **33** (2): 93–106.
- Barnett H. L., Hunter B. B. 1972 *Illustrated Genera of Imperfect Fungi*. 3rd Edition. Minneapolis: Burgess Publishing Co., 241 p.
- Bernicchia A., Gorjon S. P. 2010. Corticiaceae s. l. *Fungi Europaei*. Vol. 12. Italia: Massimo Candusso, 226 p.
- Bueno A. et al. 2010. Ophiostomatoid fungi transported by *Ips sexdentatus* (Coleoptera; Scolytidae) in *Pinus pinaster* in NW Spain. *Silva Fennica* **44** (3): 387–397.
- Burjanadze M. 2010. Efficacy of *Beauveria bassiana* isolate against pine shoot beetle *Tomicus piniperda* L. (Coleoptera, Scolytidae) in laboratory. *Bulletin of the Georgian National Academy of Sciences* **4** (3): 119–122.
- Chakraborty A. et al. 2020. Core mycobiome and their ecological relevance in the gut of five *Ips* bark beetles (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae). *Frontiers in Microbiology* **11**: 568853.  
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.568853>
- Cheng-Feng Shi, Kai-Hong Zhang, Chun-Yue Chai, Zhen-Li Yan, Feng-Li Hui. 2021. Diversity of the genus *Sugiyamaella* and description of two new species from rotting wood in China. *MycKeys* **77**: 27–39.  
<https://doi.org/10.3897/mycokeys.77.60077>
- Crous P. W. et al. 2019. Fungal Planet description sheets: 868–950. *Persoonia – Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi* **42**: 291–473.  
<https://doi.org/10.3767/persoonia.2019.42.11>.
- Davidson R. W. 1955. Wood-staining fungi associated with bark beetles in Engelmann spruce in Colorado. *Mycologia* **47** (1): 58–67.
- Davydenko K. et al. 2017. Fungi associated with *Ips acuminatus* (Coleoptera: Curculionidae) in Ukraine with a special emphasis on pathogenicity of ophiostomatoid species. *European Journal of Entomology* **114**: 77–85.  
<https://doi.org/10.14411/eje.2017.011>

- Davydenko K. et al. 2021. Fungal communities vectored by *Ips sexdentatus* in declining *Pinus sylvestris* in Ukraine: Focus on occurrence and pathogenicity of ophiostomatoid species. *Insects* **12** (12): 1119. <http://dx.doi.org/10.3390/insects12121119>
- Dean R. et al. 2012. The top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology* **13** (4): 414–430. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00783.x>
- European Environment Agency. URL: <https://eunis.eea.europa.eu/> (дата обращения 14.12.2022).
- EPPO Global Database. *Ips sexdentatus*: distribution URL: <https://gd.eppo.int/taxon/IPSXSE/distribution> (дата обращения 17.01.2023).
- Gardes M., Bruns T. D. 1993. ITS primers with enhanced specificity for *Basidiomycetes* – application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology* **2**: 113–118.
- Glasel J. 1995. Validity of nucleic acid purities monitored by 260nm/280nm absorbance ratios. *BioTechniques* **18** (1): 62–63.
- Index Fungorum. [URL: <http://www.indexfungorum.org/>] (дата обращения 14.12.2022).
- Jactel H., Gaillard J. 1991. A preliminary study of the dispersal potential of *Ips sexdentatus* (Boern.) (Col., Scolytidae) with an automatically recording flight mill. *Journal of Applied Entomology* **112** (1–5): 138–145. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0418.1991.tb01039.x>
- Jankowiak R. 2006. Fungi associated with *Tomicus piniperda* in Poland and assessment of their virulence using Scots pine seedlings. *Annals of Forest Sciences* **63** (7): 801–808.
- Jankowiak R. 2012. Ophiostomatoid fungi associated with *Ips sexdentatus* on *Pinus sylvestris* in Poland. *Dendrobiology* **68**: 43–54.
- Jankowiak R., Bilanski P. 2007. Fungal flora associated with *Tomicus piniperda* L. in an area close to a timber yard in southern Poland. *Journal of Applied Entomology* **131** (8): 579–584.
- Jeger M. et al. 2017. Scientific Opinion. On the pest categorisation of *Ips sexdentatus*. *EFSA Journal* **15** (11): 28. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.4999>
- Linnakoski R. 2011. Bark Beetle-Associated Fungi in Fennoscandia with Special Emphasis on Species of *Ophiostoma* and *Grosmannia*. *Dissertationes Forestales*, No. 119. Faculty of Science and Forestry, School of Forest Sciences, University of Eastern Finland, 74 p. <https://doi.org/10.14214/df.119>
- Linnakoski R. et al. 2010. *Ophiostoma* spp. associated with pine- and spruce-infesting bark beetles in Finland and Russia. *Persoonia – Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi* **25**: 72–93.
- Lopez S., Goldarazena A. 2012. Flight dynamics and abundance of *Ips sexdentatus* (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae) in different sawmills from northern Spain: Differences between local *Pinus radiata* (Pinales: Pinaceae) and southern France incoming *P. pinaster* timber. *Psyche* **145930** (6): 1–6. <https://doi.org/10.1155/2012/145930>.
- Nobles M. K. 1965. Identification of cultures of wood-inhabiting Hymenomyces. *Canadian Journal of Botany* **43** (9): 1097–1139. <https://doi.org/10.1139/b65-126>
- National Center for Biotechnological Information, NCBI Nucleotide. [URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>] (дата обращения 14.12.2022).
- Persson Y. et al. 2009. Fungi vectored by the bark beetle *Ips typographus* following hibernation under the bark of standing trees and in the forest litter. *Microbial Ecology* **58**: 651–659.
- Sanger F., Nicklen S., Coulson A. R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **74** (12): 5463–5467. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463>
- Soto-Robles L. V. et al. 2019. An overview of genes from *Cyberlindnera americana*, a symbiont yeast isolated from the gut of the bark beetle *Dendroctonus rhizophagus* (Curculionidae: Scolytinae), involved in the detoxification process using genome and transcriptome data. *Frontiers in Microbiology* **10**: 2180. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02180>
- Tataurov A. V. et al. 2008. Predicting ultraviolet spectrum of single stranded and double stranded deoxyribonucleic acids. *Biophysical Chemistry* **133**: 66–70.
- Urbina H. et al. 2013. *Scheffersomyces cryptocercus*: a new xylose-fermenting yeast associated with the gut of wood roaches and new combinations in the *Sugiyamaella* yeast clade. *Mycologia* **105** (3): 650–660.

- Watanabe T. 2002. Pictorial Atlas of Soil and Seed Fungi: Morphologies of Cultured Fungi and Key to Species. Boca Raton: CRC Press, 504 p.
- White T. J., Bruns T., Lee S., Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications. Vol. 18. Academic Press, Inc., p. 315–322.

## MYCOBIOTA OF *IPS SEXDENTATUS* (BÖRNER, 1776) (COLEOPTERA, CURCULIONIDAE: SCOLYTINAE) IN BELARUS

M. O. Ramanenka, S. V. Pantelev, A. A. Sazonov, L. O. Ivashchenko

*Key words:* *Ips sexdentatus*, *Pinus sylvestris* L., fungi, species diversity.

### SUMMARY

The paper presents the results of a study of the fungal component of the microbiome associated with six-toothed bark beetle on the territory of Belarus to clarify the role of this xylophage as a vector of dangerous phytopathogenic fungi. More than 360 pure cultures of fungi isolated from the surface and hemocoel of *Ips sexdentatus* were analyzed by cultural-morphological and molecular-genetic methods. 35 species of fungi from 25 genera of 17 families in 3 divisions were identified.

Based on their impact on the stored wood, all species are conventionally classified into three groups: (1) fungi that cause discoloration of wood (mold, blue stain, etc.), (2) fungi that cause rot of growing forest and harvested wood, and (3) fungi whose . Five species of fungi from the family *Ophiostomataceae* were identified: *Leptographium* Lagerb. & Melin sp., *Ophiostoma ips* (Rumbold) Nannf., *O. minus* (Hedgc.) Syd. & P. Syd., *O. canum* (Münch) Syd. & P. Syd., and *O. piceae* (Münch) Syd. & P. Syd. associated with blue wood. *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref. was found in 7.8% of the studied samples of the fungal flora. Fairly high frequency of occurrence confirms the participation of the six-toothed bark beetle in the formation of complex centres of pine desiccation in the territory of Belarus.

In the *I. sexdentatus* population, a significant proportion of entomopathogenic fungi (11.4%) was recorded using the molecular genetic method, which may indicate natural processes of self-regulation, or the attenuation of the outbreak of bark beetles in Belarus.