

УДК 632.4: 630*165.3

С. В. Пантелеев, аспирант (Институт леса НАН Беларуси);
О. Ю. Баранов, кандидат биологических наук,
ведущий научный сотрудник (Институт леса НАН Беларуси);
В. Е. Падутов, доктор биологических наук, доцент,
заведующий лабораторией (Институт леса НАН Беларуси)

МОЛЕКУЛЯРНО-ФИТОПАТОЛОГИЧЕСКОЕ ОБСЛЕДОВАНИЕ ПОЧВ СЕЛЬХОЗЗЕМЕЛЬ ДЛЯ СОЗДАНИЯ ЛЕСНЫХ ПИТОМНИКОВ

В статье рассматриваются аспекты применения молекулярно-генетических методов в диагностике видового состава микромицетов почвы земельных участков, выведенных из сельскохозяйственного оборота и предполагаемых для создания на них лесного питомника. Проведен молекулярно-фитопатологический анализ участков в трех лесничествах. Показано, что уровень содержания условно патогенной микрофлоры по результатам количественной оценки выявленных видов микромицетов в почве трех исследованных участков был низким. Установлено, что основной причиной поражения посадочного материала сосны и ели в действующем лесном питомнике является фомоз семян, вызванный аскомицетным патогенным грибом *Phoma pomorum*.

The article describes aspects of the application of molecular genetic techniques in the diagnosis of the species composition of the soil fungi on the land that was taken out of agricultural production and expected to build on it forest nursery. A molecular-phytopathological analysis was carried out in three forestry objects. It has been shown that the level of pathogenic microflora by the results of quantitative evaluation of identified fungi in the soil on the three areas was low. It was found that the main cause of shrinkage pine and spruce seedlings in the forest nursery was pathogenic fungi *Phoma pomorum*, causative agents of Phoma blight.

Введение. В настоящее время в Республике Беларусь придается большое значение искусственному лесовосстановлению и лесоразведению. Значительная часть лесных культур создается на малопродуктивных землях, выведенных из сельскохозяйственного оборота (более 100 тыс. га) [1]. На данной категории земель формируются также и лесные питомники. Выбор участка под лесной питомник осуществляют с учетом соответствия рельефа, почвенных и гидрологических условий, биологии выращиваемых пород, наличия источников полива, транспортной доступности, приближенности к лесокультурным площадям.

Немаловажным фактором, обеспечивающим получение качественного посадочного материала в создаваемых лесопитомниках, является отсутствие источников патогенной микрофлоры. С данной целью проводится предварительное фитопатологическое обследование участков. Важным элементом фитопатологического обследования является анализ почвы – установление уровня содержания патогенной и условно патогенной для семян микрофлоры. Кроме того, существенным моментом является получение данных по содержанию микоризообразующих грибов, оказывающих значимое влияние на рост и развитие семян. Следует также отметить необходимость лесопатологического обследования близлежащих насаждений, выступающих как потенциальный источник инфекции посадочного материала.

Основной способ лесопатологического обследования – визуальная оценка санитарного состояния как площади, отобранной под питомник, так и окружающих насаждений. Однако

данный подход зачастую не является оптимальным для получения достоверных данных о фитопатогенной микрофлоре.

В последнее десятилетие в практике диагностики заболеваний растений все чаще применяются методы, основанные на изучении молекул ДНК. ДНК-маркеры нашли широкое применение и получили длительную апробацию в различных областях медицины – для выявления и профилактики инфекционных заболеваний. Преимущества ДНК-маркеров перед остальными группами методов: ранняя диагностика болезней, точность определения и быстрого выполнения анализов.

Проведенные ранее работы по применению молекулярно-генетических технологий в области диагностики заболеваний посадочного материала в лесных питомниках показали, что ДНК-маркеры являются высокоточным способом диагностики таких потенциальных источников инфекции, как почва [2].

Исходя из всего вышеперечисленного, целью данной работы служит проведение молекулярно-фитопатологического обследования почв и установление видового состава почвенной микрофлоры на землях, выведенных из сельскохозяйственного и предназначенных для создания лесного питомника.

Основная часть. Объект исследований – почвенные образцы земельных участков, расположенных на территории Пинского лесхоза, выведенные из сельскохозяйственного и предлагаемые для создания лесного питомника.

Экспериментальный материал для анализа (образцы почвы) был собран в 3 лесничествах

ГЛХУ «Пинский лесхоз»: Бродницком, Ивановском, Молотковичском.

Кроме того, также был отобран материал из действующего питомника, характеризующегося наличием очагов инфекционного поражения сеянцев: образцы почвы и растения двухлетних сеянцев ели европейской, одно- и двухлетних сеянцев сосны обыкновенной с явными признаками заболеваний.

Для каждого образца сеянца были проанализированы отдельные фрагменты вегетативных органов: усохшая хвоя, неповрежденная (зеленая) хвоя, граница усыхания хвои, стебель, корень.

Молекулярно-генетический анализ проводился по следующей схеме.

На первом этапе выделялась суммарная ДНК из почвы согласно PEG-методу, тканей вегетативных органов – СТАВ-методу [3]. Амплификация маркерных регионов рибосомальной ДНК грибов проводилась методом полимеразной цепной реакции с использованием ПЦР-смеси PCR Green Mix (2X) (Fermentas, Литва) согласно протоколу фирмы-изготовителя. В качестве области амплификации был выбран 18S rRNA – ITS1 – 5,8S rDNA – ITS2 – 28S rRNA регион рибосомальной ДНК, фланкированный праймерами ITS1 и ITS4 [4]. Анализ продуктов ПЦР осуществлялся путем электрофоретического фракционирования в 2,5%-ном агарозном геле с последующим окрашиванием бромистым этидием [3]. Для видовой идентификации грибов анализируемые ПЦР-зоны вырезали из геля и секвенировали с применением генетического анализатора ABI Prism 310 (Applied Biosystems) на основании использования набора BigDye Terminator Sequence Kit v.1.1 согласно протоколу компании-изготовителя. Нуклеотидная структура секвенированных ампликонов грибов анализировалась с помощью программы BLAST в GenBank NCBI.

Структура фитопатологического обследования состояла из следующих этапов: ДНК-диагностика видового состава микромицетов в образцах сеянцев и почвы действующего (старого) питомника; идентификация видов грибов почвенной микрофлоры на участке, выделенном для создания нового питомника, сравнительный анализ данных исследованных участков.

На начальных этапах исследования видового состава грибов в качестве первичного диагностического признака были выбраны количество и размер выявляемых ампликонов изучаемых регионов рДНК. Длина данного локуса рДНК является для каждого вида величиной специфичной и постоянной.

В ходе проведенного ДНК-анализа микрофлоры хвои пораженных сеянцев было выявлено шесть доминирующих различных вариантов ампликонов, что соответствует шести различным видам грибов. Следует отметить, что в хвое без признаков усыхания генетический материал па-

тогенов находился в следовых количествах. Большинство проанализированных образцов пораженных тканей характеризовалось многофракционным ПЦР-спектром, что свидетельствовало о присутствии в анализируемом материале одновременно генетического материала более чем одного вида микромицетов. Несмотря на наличие в образцах нескольких видов грибов, отмечались варианты ампликонов с наибольшей интенсивностью, что указывало на большее количественное содержание соответствующих им видов грибов в исследуемом материале.

Ампликоны всех шести выявленных видов грибов были использованы для секвенирования. Анализ данных нуклеотидных последовательностей в Генном Банке NCBI показал сходство изученных образцов со следующими видами: *Phoma pomorum*, *Aureobasidium pullulans*, *Alternaria alternata*, *Aspergillus sp.*, *Cladosporium herbarum*, *Epicoccum sp.*

Доминирующим патогеном во всех образцах, как сосны, так и ели, явился гриб *Phoma pomorum* – возбудитель фомоза сеянцев лесных пород и сельскохозяйственных растений (в частности, кукурузы).

Анализ стеблей сеянцев в большей части не выявил существенного присутствия генетического материала патогенных грибов.

Изучение фрагментов корней у большей части образцов показало наличие микоризных грибов: *Cenococcum geophilum* и *Wilcoxina mikolae*; *Sistotrema sp.* (единичные случаи).

Сравнительный анализ ПЦР-спектров пораженных образцов сеянцев и почвы действующего (старого) питомника в Ивановском лесничестве выявил наличие фитопатогенного гриба *P. pomorum* в исследованных образцах почвы (рис. 1).

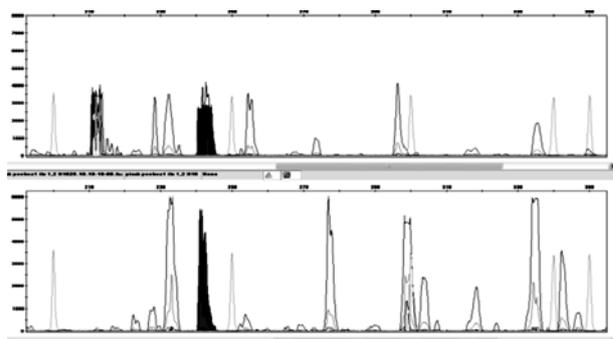


Рис. 1. ПЦР-спектр образцов микромицетов инфицированных сеянцев (сверху) и почвы (снизу)

При проведении сравнения видового состава в образцах почвы участка, предполагаемого для создания школьного отделения в Ивановском лесничестве и действующего (старого) питомника, установлен низкий титр (концентрация) специфической для хвойных патогенной микрофлоры на территории нового питомника (рис. 2).

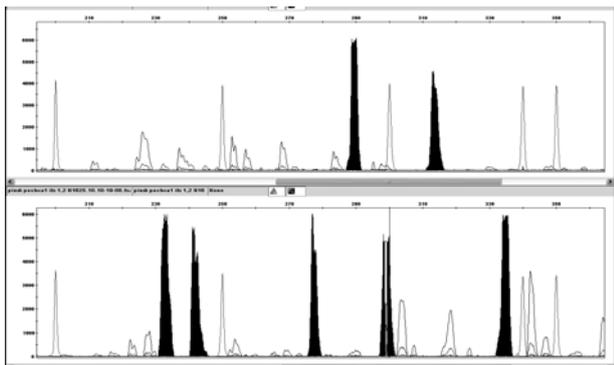


Рис. 2. ПЦР-спектр образцов микромицетов почвы участков для создания школьного отделения (сверху) и старого питомника (снизу)

В ходе исследования видового состава микромицетов почвы земель, выведенных из сельскохозяйственного использования, было установлено, что доминирующими видами грибов явились почвенные микромицеты родов: *Geomyces sp.*, *Gliocladium sp.*, *Aspergillus sp.*, *Alternaria sp.*, *Trichoderma sp.*, *Mucor sp.*, *Penicillium sp.* и др. При этом наибольшую микробиологическую активность имел участок из Бродницкого лесничества (рис. 3) по сравнению с аналогичными объектами из Ивановского и Молотковичского лесничеств (рис. 4). Однако следует отметить, что титр условно патогенных микромицетов в почве трех изученных участков Пинского лесхоза был низким (150–550 копий рДНК/образец).

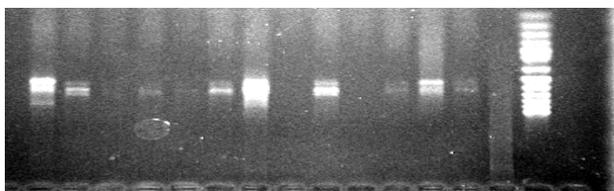


Рис. 3. ПЦР-спектр образцов микромицетов почвы (Бродницкое лесничество)

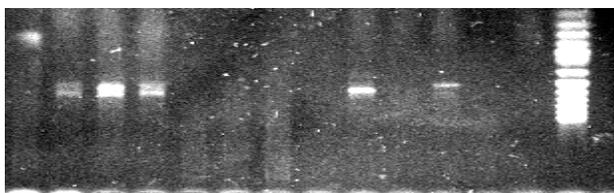


Рис. 4. ПЦР-спектр образцов микромицетов почвы (Молотковичское лесничество)

Заключение. Таким образом, проведенное фитопатологическое обследование действующего питомника выявило основную причину, определяющую поражение семян ели и сосны, – аскомицетный гриб *Phoma pomorum*, возбудитель фомоза (сухой гнили) семян. Следует отметить, что данный гриб является факультативным паразитом и длительное время может существовать в сапротрофной форме на растительных

остатках и почве. Таким образом, полученные данные еще раз свидетельствуют о необходимости регулярного мониторинга видового состава почвенной микрофлоры лесных питомников – основного потенциального источника инфекции. Как показано большим количеством исследований, основным компонентом фитопатогенной микрофлоры почвы являются некротрофные грибы, вызывающие инфекционные заболевания в основном ослабленных или имеющих повреждения растений [2]. Так, например, патогенез грибов рода *Phoma* обусловлен избыточным переувлажнением почвы, что ведет к вымоканию растений и как следствие – к снижению их иммунитета. Аналогичная стратегия развития инфекции свойственна представителям и других родов фитопатогенных грибов *Alternaria*, *Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Pythium*, вызывающих полегание всходов и семян.

Данные биологические особенности фитопатогенной микрофлоры указывают на важность соблюдения агротехнических мероприятий земель, предназначенных для создания лесных питомников, включая вопросы функционирования мелиоративных систем и создания оптимальных схем севооборота. Так, например, выявленный фитопатоген *P. pomorum* является полифагом и способен паразитировать также и на ряде сельскохозяйственных культур, в частности кукурузе, что требует дополнительной фиторемедиации почвы.

Литература

1. Крук, Н. К. Актуальные задачи лесовосстановления и лесоразведения на основе селекционного семеноводства в Республике Беларусь / Н. К. Крук // Современное состояние, проблемы и перспективы лесовосстановления и лесоразведения на генетико-селекционной основе: материалы междунар. науч.-произв. конф., Гомель, 8–10 сент. 2009 г. / Ин-т леса НАН Беларуси; редкол.: А. И. Ковалевич [и др.]. – Гомель, 2009. – С. 5–12.
2. Baranov, O. Yu. Genetic identification of fungi colonising seedlings of the Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) in the forest nursery in Korenevka (Belarus) / O. Yu. Baranov, T. Oszako, S. V. Panteleev // Folia Forestalia Polonica. – 2010. – Vol. 52 (1). – Series A. – P. 61–64.
3. Падутов, В. Е. Методы молекулярно-генетического анализа / В. Е. Падутов, О. Ю. Баранов, Е. В. Воробаев. – Минск: Юнипол, 2007. – 176 с.
4. White, T. J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics / T. J. White [et al.] // in PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications (M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky and T. J. White eds.). – New York: Academic Press Inc, 1990. – P. 315–322.

Поступила 18.02.2011