

ЛЕСОЗАЩИТА И САДОВО-ПАРКОВОЕ ХОЗЯЙСТВО

УДК 632.4:630*165.3

О. Ю. Баранов, кандидат биологических наук,
ведущий научный сотрудник (Институт леса НАН Беларуси);
С. В. Пантелеев, кандидат биологических наук,
старший научный сотрудник (Институт леса НАН Беларуси);
В. А. Ярмолович, кандидат биологических наук, доцент (БГТУ);
М. О. Романенко, аспирант (БГТУ)

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ДИАГНОСТИКИ И ИДЕНТИФИКАЦИИ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ФОМОЗА

В ходе проведенного молекулярно-фитопатологического обследования лесных питомников выявлено девять основных видов *Phoma*, вызывающих инфекционные заболевания посадочного материала сосны и ели (*Ph. pomorum*, *Ph. macrostoma*, *Ph. herbarum*, *Ph. sp.* 1-6). Сравнительный анализ диагностических локусов патогенов позволил выявить основные типы видовых отличий, связанных как с мононуклеотидными заменами, так и с олигонуклеотидными делециями/инсерциями. Сконструированы праймеры для диагностики возбудителей фомоза в растительном материале и почве методом ПЦР.

Molecular phytopathological monitoring revealed nine major species *Phoma*, causing needle blight of pine and spruce (*Ph. pomorum*, *Ph. macrostoma*, *Ph. herbarum*, *Ph. sp.* 1-6). Comparative analysis of diagnostic loci identified major types of species differences, as linked with mononucleotide substitutions, oligonucleotide deletions/insertions. Genus specific rDNA primers were designed for the diagnosis of pathogens in plant material and soil by PCR-assay.

Введение. Фомоз – инфекционное заболевание сельскохозяйственных и лесных видов растений, вызываемое сумчатыми грибами рода *Phoma* [1]. Спектр поражаемых лесных древесных видов включает значительное количество хвойных и лиственных растений. Грибы рода *Phoma* способны поражать различные органы пихты, ели, сосны, лиственницы, псевдотсуги, клена, ясеня, ореха, березы и некоторых других древесных пород. Наибольшая вредоносность фомоза наблюдается при развитии их на молодых растениях, в том числе сеянцах и саженцах в питомниках [2]. В Беларуси до настоящего времени фомоз диагностировался только на посадочном материале хвойных пород [3].

Наибольшую степень развития данное заболевание приобретает в дождливые сезоны или в периоды излишней увлажненности почвы [4]. Грибы в виде спор могут долгое время (в течение нескольких лет) сохранять свою жизнеспособность в верхних слоях почвы или подстилке. Массовое распространение возбудителей фомоза обычно отмечается весной спорами. Заражение растений происходит через верхушечные почки (затем мицелий распространяется вниз по стеблю), либо проникновение инфекции в

растение связано с заражением хвои, контактирующей с землей [5]. Этому во многом способствуют проливные дожди и дождевые брызги при искусственном поливе. Они приводят к образованию земляных конусов вокруг сеянцев или полному покрытию их почвой, что позволяет инфекции из почвы перейти на сеянец. После чего с пораженной части хвои грибок распространяется вдоль сеянца в его апикальную часть, вызывая последующую дефолиацию, а также гибель верхушечной почки. На фоне повреждения тканей грибом в пораженной хвое развивается хлороз, в особенности в местах, контактирующих с землей. Затем болезнь прогрессирует и происходит полное разрушение фотосинтетического аппарата сеянца, что в итоге приводит к гибели растения. В особой степени фомозу подвержены сеянцы, произрастающие на почвах с избыточным содержанием кальция или железа [1].

Основными внешними признаками фомоза посадочного материала является приобретение хвоей текущего года первоначально золотисто-коричневого оттенка, далее хвоя буреет и становится пепельно-серой, засыхает и опадает. На начальных этапах развития болезни снижается текущий прирост растения, затем

сеянец отмирает полностью. Растения в возрасте двух лет и старше могут погибать частично – обычно усыхает побег текущего прироста вместе с хвоей. Побеги зачастую скручиваются [5–8].

Данное заболевание имеет широкую распространенность по всему миру, однако для Беларуси оно является новым. Вследствие этого литературные данные, посвященные фомозу лесных видов в республике, в значительной степени ограничены. Однако, по всей видимости, редкие случаи выявления данного заболевания в нашей стране во многом связаны со сложностью диагностики инфекции стандартными методами, особенно когда симптомы болезни сводятся к пожелтению и усыханию хвои или гибели растений. К тому же спороношения гриба на поверхности пораженных органов при этом отсутствуют. Например, побурение и отмирание хвои посадочного материала, которое наблюдается при фомозе, часто принимают за болезни типа шютте (обыкновенное, снежное и др.).

Исходя из всего вышесказанного, целью данной работы является изучение видоспецифических особенностей диагностических локусов возбудителей фомоза посадочного материала лесных древесных пород для последующей разработки молекулярно-генетического метода их ранней диагностики и видовой идентификации. Научная новизна полученных результатов заключается в установлении доминирующего видового состава *Phoma* на территории Беларуси, выявлении и типировании не имеющих микологического описания видов, уточнении систематического положения рода *Phoma*.

Материалы и методы исследований. Материал для анализа был собран в течение 2011–2013 гг. на территории 38 лесных питомников, расположенных в лесхозах Гомельского, Минского, Могилевского, Гродненского, Витебского и Брестского ГПЛХО. Для молекулярно-фитопатологической диагностики были отобраны образцы фрагментов растительных вегетативных органов лесного посадочного материала с признаками инфекционного поражения. Общее число изученных образцов инфицированных растений составило 1120 шт. В ходе анализа изучен посадочный материал различного возраста 11 лесных пород: сосна, ель, туя, пихта, лиственница, можжевельник, береза, дуб, клен, липа, ясень. Для фитопатологического анализа почвы на территории лесных питомников был собран дополнительный экспериментальный материал, представленный 260 почвенными пробами из ризосферы инфицированных сеянцев.

Выделение ДНК производилось из растительных тканей СТАВ-методом, почвы – PEG-методом без предварительного получения чистых культур патогенов [9]. Для сравнительного анализа также были исследованы и образцы нормальных тканей.

ПЦР-анализ выполнялся с применением DreamTaq™ Green PCR Master Mix (Fermentas), согласно инструкции фирмы-производителя. В ходе исследования были использованы универсальные праймеры ITS1 и ITS4, фланкирующие регион рДНК: ITS1 – 5,8S рРНК – ITS2 [10]. Электрофоретическое фракционирование ампликонов проводилось в 1%-ном агарозном геле High Efficiency of Separation (Pharmacia Biotech) с целью эффективного их разделения и типировки. 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 в соответствии с протоколом компании-изготовителя. Нуклеотидная структура секвенированных ампликонов грибов анализировалась с помощью программы BLAST в GenBank NCBI [11].

Результаты и обсуждение. В ходе проведенного ДНК-анализа микрофлоры посадочного материала и почвы был выявлен широкий спектр видов микромицетов. При этом представители рода *Phoma* [12] были идентифицированы только в посадочном материале хвойных видов растений. Также следует отметить, что среди обнаруженных инфекционных заболеваний сеянцев и саженцев сосны и ели (в исследуемый период) фомоз характеризовался наибольшей распространенностью и был диагностирован у 34% зараженных растений.

В инфицированном посадочном материале *Phoma* spp. были представлены как в виде моноинфекции, так и формировали сложные патогенетические комплексы с рядом экологически сходных грибов родов *Sphaeropsis*, *Epicoccum*, *Botrytis* и др.

Проведенный сравнительный молекулярно-генетический анализ всех выявленных изолятов показал их принадлежность к девяти видам, три из которых были идентифицированы как *Ph. pottedorum*, *Ph. macrostoma*, *Ph. herbarum*, шесть не имели гомологии с образцами, представленными в генетической базе данных NCBI (более 100 видов). При этом уровень генетических различий диагностических локусов данных изолятов составлял более 2%, что указывает на их видовую самостоятельность [13–16].

Изучение генетической изменчивости выявленных изолятов *Phoma* spp. показало высокий

уровень консервативности видоспецифических регионов рДНК возбудителей фомоза, что в свою очередь свидетельствует об их функциональной значимости, а также о космополитном характере расселения данных видов в процессе филогенеза. Так, например, изолят *Ph. pomorum*, выявленный в питомнике Быховского лесхоза, имел 99% схожесть в последовательности ДНК с мексиканским штаммом *Ph. pomorum* AY904062.1 и корейским штаммом *Phoma* sp. FJ950743. Изолят *Phoma* sp. 3 из питомника Милошевичского лесхоза обладал 99% генетическим сходством с *Phoma* sp. NRRL JN093264.1 (США), *Phoma* sp. P48E6 JN207352 (Венесуэла), *Phoma* sp. CPO 10.003 JQ388280 (Мексика), *Phoma herbarum* JQ936331.1 (Бразилия), *Phoma herbarum* GU073116 (Китай) и *Phoma* sp. R79-10 AB693778 (Япония). Изоляты *Phoma* spp., выявленные в Октябрьском лесхозе, на 99% были идентичны таковым из Венесуэлы (JN207352), США (HQ846581), Китая (HQ696085), Японии (AB693798) и Кореи (HM008925) и др.

Детальный анализ структуры локусов рДНК выявленных генотипов *Phoma* spp. показал видоспецифические особенности нуклеотидных последовательностей, связанные с делецией/инсерцией олигомерных фрагментов во втором внутреннем транскрибируемом спейсере. Идентифицированные делетированные фрагменты включают в себя дуплицированные последовательности нуклеотидов (-GCGC- и -AGGC-), расположенные рядом. Кроме того, детальное изучение структуры спейсера выявило большое число повторяющихся последовательностей внутри ВТС2 (CGT-мотив), что указывает на наличие процессов дубликации нуклеотидных последовательностей в ходе филогенеза и их последующую дивергенцию между видами [17]. Результаты кластеризации (на основании сопоставления нуклеотидных последовательностей) изученных изолятов *Phoma* spp. выявили на дендрограмме два отдельных видовых кластера, уровень генетических различий между усредненными образцами которых составил 2,2% (22 отличия на 1000 нуклеотидов).

Для уточнения таксономического положения рода *Phoma* в ходе исследований было проведено сравнение усредненных генотипов изолятов с другими представителями класса домиомицетов – *Teratosphaeria*, *Epicoccum*, *Alternaria*, *Venturia*, *Cladosporium*, *Sphaeropsis* [12]. Исходя из полученных коэффициентов генетической дифференциации установлено, что род *Phoma* является генетически близким к видам семейства *Pleosporaceae*. Таким образом, полученные генетические данные могут быть использованы для отнесения рода *Phoma* к плеос-

поровым грибам. Кроме того, уровень выявленных генетических различий между *Phoma* и *Epicoccum* не превысил 1,5%, что может послужить предпосылкой для ревизии данных родов и их последующего объединения.

На основании определения родоспецифических регионов в нуклеотидной последовательности рДНК были сконструированы специфические праймеры для молекулярно-генетической диагностики белорусских изолятов *Phoma* spp. методами классической ПЦР и ПЦР в реальном времени.

Заключение. Проведенное молекулярно-фитопатологическое обследование лесных питомников позволило выявить девять видов грибов рода *Phoma*, предварительно оцененных как патогенные по отношению к сеянцам и саженцам сосны и ели. В ходе сравнительного анализа диагностических локусов патогенов обнаружены основные типы видовых отличий. На основании изучения консервативных (внутри рода *Phoma*) регионов рДНК сконструированы праймеры для диагностики возбудителей фомоза в растительном материале и почве методом ПЦР.

Литература

1. Davidson J. A. A new species of *Phoma* causes ascochyta blight symptoms on field peas (*Pisum sativum*) in South Australia // The Mycological Society of America. 2009. Vol. 101. P. 120–128.
2. Шевченко С. В., Цилюрик А.В. Лесная фитопатология. Киев: Вища школа, 1986. 382 с.
3. Молекулярно-генетическая диагностика грибных болезней в лесных питомниках / О. Ю. Баранов [и др.] // Лесное и охотничье хозяйство. 2012. № 6. С. 21–29.
4. Семенкова И. Г., Соколова Э. С. Фитопатология: учеб. для студ. вузов. М.: Издат. центр «Академия», 2003. 480 с.
5. James R. L. Lodgepole pine seedling chlorosis and mortality at the Bessey Nursery, Nebraska / Bio. Eval. R2-79-2. Denver, CO: U.S. Department of Agriculture, Forest Service, State and Private Forestry, Rocky Mountain Region. 1979. 10 p.
6. James R. L. Engelmann spruce needle and twig blight at the Coeur d'Alene Nursery, Idaho / U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Northern Region. 1980. 7 p.
7. James R. L. Mortality of Mugo pine seedlings at the Fantasy Farms Nursery, Peck, Idaho / U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Northern Region. 1983. 7 p.
8. *Phoma* blight of fir and Douglas-fir seedlings in a California nursery / J. T. Kliejunas [et al.] // Plant Disease. 1985. Vol. 69. P. 773–775.

9. Падутов В. Е., Баранов О. Ю., Воропаев Е. В. Методы молекулярно-генетического анализа. Минск: Юнипол, 2007. 176 с.

10. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics / T. J. White [et al.] // PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications / M. A. Innis [et al.]. New York: Academic Press Inc., 1990. P. 315–322.

11. National Center for Biotechnological Information, NCBI [Electronic resource]. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> (date of access: 14.09.2011).

12. Fungal Databases Nomenclature and Species Banks [Electronic resource]. URL: <http://www.mycobank.org> (date of access: 14.09.2011).

13. Molecular diagnostics for fungal plant pathogens / H. Alastair [et al.] // Pest Management Science. 2003. Vol. 59. P. 129–142.

14. Berbee M. The phylogeny of plant and animal pathogens in the Ascomycota // Physiological and Molecular Plant Pathology. 2001. Vol. 59. P. 165–187.

15. Borman A. M. Molecular identification of pathogenic fungi // Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2010. Vol. 61. P. 7–12.

16. Дьяков Ю. Т. Общая и молекулярная фитопатология. М.: Общ-во фитопатологов, 2001. 301 с.

17. Levinson G., Gutman G. A. Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution // Molecular Biology and Evolution. 1987. Vol. 4. P. 203–221.

Поступила 04.02.2014