

УДК 632.4:630\*165.3

С. В. Пантелеев<sup>1</sup>, О. Ю. Баранов<sup>1</sup>, И. Э. Рубель<sup>1</sup>,  
В. А. Ярмолович<sup>2</sup>, Н. Г. Дишук<sup>3</sup>, М. О. Середич<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Институт леса Национальной академии наук Беларуси

<sup>2</sup>Белорусский государственный технологический университет

<sup>3</sup>Центральный ботанический сад Национальной академии наук Беларуси

### БОЛЕЗНИ ПОСАДОЧНОГО МАТЕРИАЛА ХВОЙНЫХ ПОРОД С ЗАКРЫТОЙ КОРНЕВОЙ СИСТЕМОЙ В ПОСТОЯННЫХ ПИТОМНИКАХ МОГИЛЕВСКОЙ ОБЛАСТИ ПО ДАННЫМ МОЛЕКУЛЯРНО-ФИТОПАТОЛОГИЧЕСКОГО ОБСЛЕДОВАНИЯ

Проведено молекулярно-фитопатологическое обследование посадочного материала хвойных пород с закрытой корневой системой в восьми базисных питомниках Mogilevского ГПЛХО. В ходе исследования в растительных тканях был выявлен генетический материал патогенных грибов, эндوفитная и сапрофитная (непатогенная) микрофлора. Исследованные образцы характеризовались полиинфекционным поражением и содержали высокий титр возбудителей болезней. С использованием молекулярно-генетических методов диагностики идентифицированы возбудители доминирующих заболеваний сеянцев сосны, ели и лиственницы, выращиваемых в кассетах. Установлено, что преобладающим заболеванием однолетних сеянцев ЗКС является кладоспориоз, вызванный комплексом микромицетов с доминированием нового вида из рода *Cladosporium*. Кладоспориоз был отмечен в 60% обследованных питомников, встречаемость его возбудителей в пораженном растительном материале составляла 50–70%. Данному заболеванию сопутствовали возбудители серой плесени и ризоктониоза, зарегистрированные в 12% питомников. Встречаемость их в пораженном растительном материале не превышала 25%. Двухлетние сеянцы ЗКС в 37% обследованных питомников были поражены фомозом. Встречаемость его возбудителей в пораженном растительном материале составляла 40–60%. В единичных лесхозах наряду с данным заболеванием выявлены цитоспороз, эпикоккоз и серая плесень (50%, 40% и 15% случаев соответственно).

**Ключевые слова:** ПМЗКС, ДНК, ПЦР, праймеры, серая плесень, кладоспориоз, фомоз, ризоктониоз, эпикоккоз, цитоспороз.

S. V. Panteleev<sup>1</sup>, O. Yu. Baranov<sup>1</sup>, I. E. Rubel<sup>1</sup>,  
V. A. Yarmolovich<sup>2</sup>, N. G. Dishuk<sup>3</sup>, M. O. Seredich<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Institute of Forest of the National Academy of Sciences of Belarus

<sup>2</sup>Belarusian State Technological University

<sup>3</sup>Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus

### DISEASES OF CONTAINER-GROWN CONIFERS IN THE NURSERIES OF MOGILEV AREA ACCORDING TO MOLECULAR PHYTOPATHOLOGICAL SURVEY

A molecular phytopathological survey of diseased container-grown conifers in the nurseries of Mogilev SPPA were carried out. In plant tissues was detected genetic material of pathogenic fungi, endophytic and saprophytic (non-pathogenic) microflora. The samples studied were characterized by poly-infection and contain a high titer of pathogens. Molecular-genetic diagnostic methods used for identified causative agents of dominant diseases of container-grown pine, fir and larch seedlings. It was established that the predominant disease of 1-year seedlings is Cladosporium blight, caused by fungi complex with the dominance of a new species of the genus *Cladosporium*. Cladosporium blight was observed in 60% of the surveyed nurseries, the occurrence of its agents in the affected plant material ranged 50–70%. The disease accompanied by causative agents of Rhizoctonia root rot and Gray mold that registered with the 12% nurseries. Their occurrence in the affected plant material does not exceed 25%. In 37% of the surveyed nurseries 2-year seedlings were struck by Phoma blight. Occurrence of its agents in the affected plant material ranged 40–60%. In single forestries along with Phoma blight detected Cytospora stem canker, Epicoccum needle necrosis and Gray mold (50%, 40% and 15%, respectively).

**Key words:** Container-grown conifers, DNA, PCR, primers, Phoma blight, Cladosporium blight, Rhizoctonia root rot, Cytospora stem canker, Epicoccum needle necrosis.

**Введение.** Использование в лесовосстановлении лесного посадочного материала с комом

почвы («Clod seedlings») известно с XVIII в. В 1725 г. таким способом транспортировали для

посадки дички дуба в странах Центральной Европы [1]. На протяжении практически 300 лет технология выращивания посадочного материала с закрытой корневой системой (ПМЗКС) совершенствовалась, были изобретены специальные контейнеры и цилиндры, обеспечивающие удобную транспортировку с минимальным повреждением корней, хранение до высадки в грунт и повышение приживаемости [2]. Однако, несмотря на ряд преимуществ перед традиционной технологией, изоляцию растений от источника инфекции – почвы, проблема заболеваний ПМЗКС остается по сей день [3, 4].

В связи с этим целью работы являлась диагностика и идентификация возбудителей инфекционных заболеваний лесного посадочного материала с закрытой корневой системой.

**Основная часть.** Объектом исследования являлся ПМЗКС хвойных пород с признаками инфекционного поражения в лесных питомниках Могилевского ГПЛХО. В ходе исследования проведено фитопатологическое обследование лесных питомников восьми лесхозов: ГОЛХУ «Осиповичский опытный лесхоз», ГЛХУ «Кличевский лесхоз», ГЛХУ «Бельничский лесхоз», ГЛХУ «Быховский лесхоз», ГЛХУ «Горечий лесхоз», ГЛХУ «Костюковичский лесхоз», ГЛХУ «Чериковский лесхоз», ГЛХУ «Краснопольский лесхоз». Экспериментальный материал был представлен однолетними сеянцами сосны обыкновенной, лиственницы европейской, а также одно- и двухлетними сеянцами ели европейской. Посадочный материал характеризовался внешними признаками заболевания: частичным и полным усыханием хвои, отмиранием верхушечной почки.

Диагностика инфекции и видовой идентификация возбудителей болезней была выполнена на основании использования методов ДНК-анализа. Для проведения молекулярно-фитопатологической экспертизы с пораженного растительного материала были взяты фрагменты тканей хвои, стеблей и корней. Пробы отобраны в тройной повторности. Итого было исследовано 90 образцов с каждого обследованного лесхоза. Маркерным регионом была выбрана последовательность ядерной ДНК: 18S-ITS1-5,8-ITS2-28S, которая содержит гены, кодирующие структурные компоненты рибосом – рРНК. Данный регион является величиной видоспецифичной и постоянной внутри вида. Эта особенность рДНК-маркера позволяет использовать данный признак как диагностический критерий при проведении видовой идентификации. Полученные препараты суммарной ДНК амплифицировались по принципу ПЦР с использованием реагента PCR Green Mix (2X) (Fermentas, Литва) и праймеров ITS1F (F)

5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3', ITS4 (R) 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'.

В ходе исследования в растительных тканях был выявлен генетический материал патогенных грибов, эндофитная и сапрофитная (непатогенная) микрофлора. Электрофоретическое фракционирование показало, что исследованные образцы характеризовались многофракционными ПЦР-спектрами, что свидетельствовало о поливидовой инфекции, т. е. заражением двумя и более видами микромицетов. Титр патогенной микрофлоры варьировался от 10 и до более 1000 клеток патогена на 5 мг растительной ткани, что указывало на наличие в тканях доминирующих и сопутствующих видов.

Для идентификации доминирующей микрофлоры поливидовой инфекции ампликоны грибов разделялись путем электрофоретического фракционирования в 2% агарозном геле и извлекались для дальнейшего секвенирования. Молекулярно-генетическая идентификация видов грибов проводилась по базе данных ГНУ «Институт леса НАН Беларуси» и международного генного банка NCBI (Национальный центр биотехнологической информации, США) [5].

По результатам молекулярно-генетического анализа установлено, что преобладающим заболеванием однолетних сеянцев ЗКС является кладоспориоз, вызванный комплексом микромицетов с доминированием нового вида из рода Кладоспорий – *Cladosporium* sp. Кладоспориоз был отмечен в 60% обследованных питомников, встречаемость его возбудителей в пораженном растительном материале составляла 50–70%. Следует отметить, что симптомы диагностированного заболевания отличались от оливковой плесени сеянцев, вызываемой грибами этого же рода (*C. herbarum* и *C. cladosporioides*), и характеризовались усыханием верхушечной почки растения.

Сравнительный генетический анализ данного вида в базе данных международного генного банка NCBI показал ближайшее родство *Cladosporium* sp. (99% сходства по генетической структуре) с некультивируемым видом *Uncultured Cladosporium* clone IBL167f, выявленным учеными J. A. Nowakowska с сотрудниками в 2016 г. на корнях усыхающих дубов в насаждениях западно-центральной части Польши в районе г. Кротошин. Меньшее сходство (98–99%) было установлено со следующими видами: *Cladosporium iridis*, *Cladosporium allii* (идентифицированы французскими учеными M. Comby с сотрудниками на пшенице в 2015 г.); *Cladosporium* sp. (идентифицирован немецкими учеными K. Glynn с сотрудниками на ярутке пронзенной в 2015 г.); *Cladosporium subinflatum* (украинский изолят, выделенный А. Акуловым с ириса и идентифицированный голландскими

учеными К. Bensch с сотрудниками в 2015 г.); *Cladosporium allacinum* (идентифицирован голландскими учеными К. Bensch с сотрудниками на робинии в 2015 г.) [5].

Учитывая данные, полученные голландскими учеными К. Bensch с сотрудниками, в ходе филогенетических исследований различных видовых комплексов возбудителей кладоспориоза, идентифицированный новый вид и вышеперечисленные близкородственные грибы, по всей вероятности, относятся к комплексу видов *C. herbarum* [6].

В Костюковичском лесхозе на однолетних сеянцах сосны кладоспориозу сопутствовал возбудитель серой плесени (*Botrytis cinerea*). Встречаемость его в пораженном растительном материале не превышала 10%.

В Горецком лесхозе наряду с кладоспориозом на однолетних сеянцах сосны, ели и лиственницы выявлен корневидный грибок *Rhizoctonia solani* J. G. Kuhn, возбудитель ризоктониоза. Встречаемость его в пораженном растительном материале варьировалась от 15 до 25%. Наибольшая концентрация данного патогена отмечалась в корнях и стеблях сеянцев.

В Чериковском лесхозе в стеблях сеянцев ели, пораженных кладоспориозом, в 50% случаев идентифицирован грибок *Cadophora luteo-olivacea*. Данный вид является малоизученным патогеном, ассоциированным с усыханием стволов винограда («Grapevine Trunk Disease») [7]. Согласно литературным данным в странах Европы и Азии грибок поражает также другие плодово-ягодные культуры (яблоня, груша) и сорные растения [5]. Случаи выявления на ели отмечаются в Канаде и Финляндии [8]. В Словении в 2013 г. учеными Т. Hauptman с сотрудниками *C. luteo-olivacea* выявлена в древесине ясеня обыкновенного, пораженного халаровым некрозом [9]. Вид зарегистрирован также в Антарктиде в древесных постройках исследовательских станций [10].

Единственный случай альтернариоза был отмечен в Краснопольском лесхозе на однолетних сеянцах ели. Идентифицированный возбудитель – грибок *Alternaria* sp., принадлежит к видовому комплексу *A. alternata*, распространенному в питомниках. Встречаемость *Alternaria* sp. в пораженном растительном материале составила 30%.

Двухлетние сеянцы ели ЗКС в 37% обследованных питомников были поражены фомозом. Возбудитель данного заболевания *Phoma* sp.1 является белорусским штаммом, родствен-

ным патогену *P. pomorum* и идентифицированным ранее в лесных питомниках Беларуси на сеянцах и саженцах открытого грунта [11]. Встречаемость данного возбудителя в пораженном растительном материале варьировалась от 50 до 60% в различных лесхозах. В Осиповичском опытном лесхозе наряду с *Phoma* sp.1 в 40% случаев идентифицирован распространенный в Европе вид *Phoma herbarum*.

Следует отметить, что инфекционную нагрузку в данном лесхозе усиливает возбудитель цитоспороза – новый вид гриба *Cytospora* sp., выявленный в стеблях двухлетней ели в 50% случаев. Сравнительный генетический анализ данного вида в базе данных международного генного банка NCBI показал практически 100% генетическое сходство с двумя штаммами *Cytospora* sp. Orlim 554 и Orlim784, выявленными и идентифицированными латвийскими учеными R. Vasiliauskas, V. Lygis и J. Stenlid в древесине ели с признаками инфекционного поражения [5]. Полученные данные свидетельствуют о том, что сравниваемые штаммы принадлежат к одному виду, мутировавшему в разных экологических условиях. Из описанных грибов ближайший родственник (98% генетического сходства) – возбудитель рака ствола эвкалипта *Cytospora cedri*, инвазия которого уже отмечена в США.

В 15% случаев фомозу сопутствовала серая плесень (*B. cinerea*) в Горецком лесхозе.

В Быховском лесхозе в комплексе с возбудителями фомоза в 40% случаев идентифицирован *Epicoccum nigrum* – возбудитель эпикоккоза.

**Заключение.** Поражение данными видами грибов связано с первичным действием сторонних неблагоприятных факторов (климатические, почвенные условия, нарушение агротехники выращивания), вызвавших ослабление растений. Учитывая изоляцию посадочного материала от почвы, можно сделать вывод о некачественной стерилизации субстрата и изначально наличии инфекционного начала. Факторами ослабления в случае ПМЗКС могут служить несоответствие субстрата по физическим и химическим свойствам выращиваемому материалу (температура, влажность, кислотность, содержание солей и др.), несоответствие типа контейнеров морфологии корней выращиваемого материала, нарушение технологии выращивания по причине более высокой требовательности к проводимым мероприятиям по сравнению с традиционной посадкой.

### Литература

1. Toman J., Hocking D. A brief History and Some Perspectives of Ball Planting // Skogshogskolan. 1973. Vol. 44. P. 4–6.
2. Barnett J. P., Brissette J. C. Producing southern pine seedlings in containers // USDA Forest Service. 1986. P. 6–14.

3. Lilja A., Poteri M., Petaisto R. L., Rikala R., Kurkela T., Kasanen R. Fungal Diseases in Forest Nurseries in Finland // *Silva Fennica*. 2010. Vol. 44. P. 525–545.
4. Dumroese R. K., James R. L. Root diseases in bareroot and container nurseries of the Pacific Northwest: epidemiology, management, and effects on outplanting performance // *New Forests*. 2005. Vol. 30. P. 185–202.
5. The National Center for Biotechnology Information (NCBI) [Electronic resource]. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/> (accessed 10.01.2016).
6. Bensch K., Groenewald J. Z., Braun U., Dijksterhuis J., Yanez-Morales M. J., Crous P.W. Common but different: The expanding realm of *Cladosporium* // *Studies In Mycology*. 2015. Vol. 82. P. 23–74.
7. Gramaje D., Mostert L., Armengol J. Characterization of *Cadophora luteo-olivacea* and *C. melinii* isolates obtained from grapevines and environmental samples from grapevine nurseries in Spain // *Phytopathol. Mediterr.* 2011. Vol. 50. P. 112–126.
8. Berubea J. A., Nicolas G. G. Alien fungal species on asymptomatic live woody plant material imported into Canada // *Canadian Journal of Plant Pathology*. 2015. Vol. 37. P. 67–81.
9. Hauptman T., Piskur B., de Groot M., Ogris N., Ferlan M., Jurc D. Temperature effect on *Chalara fraxinea*: heat treatment of saplings as a possible disease control method // *Forest Pathology*. 2013. Vol. 43. P. 360–370.
10. Blanchette R. A., Held B. W., Arenz B. E., Jurgens J. A., Baltés N. J., Duncan S. M., Farrell R. L. An Antarctic Hot Spot for Fungi at Shackleton's Historic Hut on Cape Royds // *Microb Ecol.* 2010. Vol. 60. P. 29–38.
11. Баранов О. Ю., Пантелеев С. В., Ярмолевич В. А., Романенко М. О. Молекулярно-генетические аспекты диагностики и идентификации возбудителей фомоза // *Труды БГТУ*. 2014. № 1: Лесное хоз-во. С. 198–201.

#### References

1. Toman J., Hocking D. A brief History and Some Perspectives of Ball Planting. *Skogshogskolan*, 1973, vol. 44, pp. 4–6.
2. Barnett J. P., Brissette J. C. Producing southern pine seedlings in containers. *USDA Forest Service*, 1986, pp. 6–14.
3. Lilja A., Poteri M., Petaisto R. L., Rikala R., Kurkela T., Kasanen R. Fungal Diseases in Forest Nurseries in Finland. *Silva Fennica*, 2010, vol. 44, pp. 525–545.
4. Dumroese R. K., James R. L. Root diseases in bareroot and container nurseries of the Pacific Northwest: epidemiology, management, and effects on outplanting performance. *New Forests*, 2005, vol. 30, pp. 185–202.
5. The National Center for Biotechnology Information (NCBI) [Electronic resource]. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/> (accessed: 10.01.2016).
6. Bensch K., Groenewald J. Z., Braun U., Dijksterhuis J., Yanez-Morales M. J., Crous P.W. Common but different: The expanding realm of *Cladosporium*. *Studies In Mycology*, 2015, vol. 82, pp. 23–74.
7. Gramaje D., Mostert L., Armengol J. Characterization of *Cadophora luteo-olivacea* and *C. melinii* isolates obtained from grapevines and environmental samples from grapevine nurseries in Spain. *Phytopathol. Mediterr.*, 2011, vol. 50, pp. 112–126.
8. Berubea J. A., Nicolas G. G. Alien fungal species on asymptomatic live woody plant material imported into Canada. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 2015, vol. 37, pp. 67–81.
9. Hauptman T., Piskur B., de Groot M., Ogris N., Ferlan M., Jurc D. Temperature effect on *Chalara fraxinea*: heat treatment of saplings as a possible disease control method. *Forest Pathology*, 2013, vol. 43, pp. 360–370.
10. Blanchette R. A., Held B. W., Arenz B. E., Jurgens J. A., Baltés N. J., Duncan S. M., Farrell R. L. An Antarctic Hot Spot for Fungi at Shackleton's Historic Hut on Cape Royds. *Microb Ecol.*, 2010, vol. 60, pp. 29–38.
11. Baranov O. Yu., Panteleev S. V., Yarmolovich V. A., Romanenko M. O. Molecular genetic aspects of diagnostics and identification of Phoma Blight agents. *Trudy BGTU* [Proceedings of BSTU], 2014, no. 1: Forestry, pp. 198–201 (In Russian).

#### Информация об авторах

**Пантелеев Станислав Викторович** – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории генетики и биотехнологии. Институт леса Национальной академии наук Беларуси (246001, г. Гомель, ул. Пролетарская, 71, Республика Беларусь). E-mail: pukidesu@gmail.com

**Баранов Олег Юрьевич** – кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории генетики и биотехнологии. Институт леса Национальной академии наук Беларуси (246001, г. Гомель, ул. Пролетарская, 71, Республика Беларусь). E-mail: betula-belarus@mail.ru

**Рубель Илья Эдуардович** – младший научный сотрудник лаборатории генетики и биотехнологии. Институт леса Национальной академии наук Беларуси (246001, г. Гомель, ул. Пролетарская, 71, Республика Беларусь). E-mail: rubellia@mail.ru

**Ярмолович Василий Александрович** – кандидат биологических наук, доцент, доцент кафедры лесозащиты и древесиноведения. Белорусский государственный технологический университет (220006, г. Минск, ул. Свердлова, 13а, Республика Беларусь). E-mail: yarm@belstu.by

**Дишук Наталья Георгиевна** – кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник. Центральный ботанический сад Национальной академии наук Беларуси (г. Минск, ул. Сурганова, 2в, Республика Беларусь). E-mail: dishukn@rambler.ru

**Середич Марина Олеговна** – аспирант кафедры лесозащиты и древесиноведения. Белорусский государственный технологический университет (220006, г. Минск, ул. Свердлова, 13а, Республика Беларусь). E-mail: romina\_mo@bk.ru

#### Information about the authors

**Pantelev Stanislav Victorovich** – PhD (Biology), Senior Researcher, Laboratory of Genetics and Biotechnology. Institute of Forest of the National Academy of Sciences of Belarus (71, Proletarskaya str., Gomel, 246001, Republic of Belarus). E-mail: pukidesu@gmail.com

**Baranov Oleg Yur'evich** – PhD (Biology), Leading Researcher, Laboratory of Genetics and Biotechnology. Institute of Forest of the National Academy of Sciences of Belarus (71, Proletarskaya str., Gomel, 246001, Republic of Belarus). E-mail: betula-belarus@mail.ru

**Rubel' Il'ya Eduardovich** – Junior Researcher, Laboratory of Genetics and Biotechnology. Institute of Forest of the National Academy of Sciences of Belarus (71, Proletarskaya str., Gomel, 246001, Republic of Belarus). E-mail: rubellia@mail.ru

**Yarmolovich Vasiliy Aleksandrovich** – PhD (Biology), Assistant Professor, Assistant Professor, the Department of Forest Protection and Wood Science. Belarusian State Technological University (13a, Sverdlova str., 220006, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: yarm@belstu.by

**Dishuk Natal'ya Georgievna** – PhD (Biology), Leading Researcher. Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus (2в, Surganova str., 220050, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: dishukn@rambler.ru

**Seredich Marina Olegovna** – PhD student, the Department of Forest Protection and Wood Science. Belarusian State Technological University (13a, Sverdlova str., 220006, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: romina\_mo@bk.ru

*Поступила 16.02.2015*