

УДК 632.4:630\*44

**С. В. Пантелев**, младший научный сотрудник (Институт леса НАН Беларуси)**ОЦЕНКА РОЛИ НАСЕКОМЫХ В РАСПРОСТРАНЕНИИ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ  
КЛАДОСПОРИОЗА И АЛЬТЕРНАРИОЗА В ЛЕСНЫХ ПИТОМНИКАХ  
НА ОСНОВАНИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДОВ ДНК-АНАЛИЗА**

В статье рассматриваются аспекты применения молекулярно-генетических методов в диагностике видового состава микромицетов в тканях насекомых с целью выяснения роли последних в качестве переносчиков возбудителей основных заболеваний лесных древесных видов в питомниках. Проведен молекулярно-фитопатологический анализ образцов насекомых и пораженных тканей сеянцев и саженцев в пяти лесхозах. В тканях насекомых выявлен спектр видов патогенных грибов, среди которых доминируют виды родов *Cladosporium* и *Alternaria*. Установлено, что насекомые могут являться одним из потенциальных факторов переноса и распространения ряда фитопатогенных грибов в лесных питомниках.

In the article author discusses aspects of molecular genetic techniques in the diagnosis of fungal species composition in the tissues of insects in order to clarify their role as vectors of pathogens of major diseases of forest tree species in nurseries. A molecular phytopathological analysis of insects and infected tissues samples of seedlings and saplings was carried out in five forestries. In the tissues of insects detected spectrum of pathogenic fungi, among which are dominated by species of *Cladosporium* and *Alternaria*. It was found that the insects could be one of the potential factors at the transport and distribution of several fungi pathogens in forest nurseries.

**Введение.** Насекомые – одна из многочисленных групп животных, распространенных повсеместно в разнообразных местах обитания и насчитывающая более 1,5 млн. видов. Помимо нанесения прямого ущерба растениям, большинство *Insecta* являются фитофагами, насекомые часто представляют косвенную угрозу, выступая в качестве переносчиков инфекционных агентов для многих растительных видов. При этом перенос возбудителя может протекать как неспецифическим, так и специфическим путями. При неспецифическом переносе (или произвольном) патогены в виде спор переносятся на внешних покровах, прикрепляясь к кутикуле различных частей тела насекомого, либо попадают в пищеварительную систему при поедании тканей пораженного растения. При специфическом (в случае многих ксилофагов) насекомые в ходе жизненного цикла «культивируют» микроорганизмы на растительном субстрате и используют в качестве источника питания. При этом зачастую в теле насекомого имеются специализированные структуры, служащие для переноса спор патогенов. Таким образом, насекомые-фитофаги являются потенциальными векторами при переносе инфекции.

Основными характеристиками зоохории являются высокая скорость распространения заболеваний, поражение как ослабленных, так и здоровых растений, возможность перемещения болезнетворных микроорганизмов на значительные расстояния и наличие видовой специализации возбудителей к переносчикам.

Согласно литературным данным, зачастую массовые вспышки численности насекомых-вредителей сопровождаются последующим раз-

витием и распространением инфекционных заболеваний, вплоть до эпифитотий [1].

Однако, несмотря на то, что данный способ распространения свойственен представителям ряда классов грибов, в имеющихся литературных источниках представлено незначительное количество исследований в области трансмиссивных заболеваний лесных пород. Данные о переносе насекомыми фитопатогенных агентов являются разрозненными и неполными, что связано с отсутствием до настоящего времени соответствующих методов анализа, позволяющих выполнять диагностику фитопатогенов у насекомых [2–4].

Появление технологий ДНК-маркирования позволило выполнять идентификацию фитопатогенов на качественно новом уровне. Во-первых, для ДНК-анализа требуется небольшое количество исследуемого материала (несколько миллиграмм). Во-вторых, применение специфических праймеров позволяет выявлять ДНК-возбудителя в образце в микроскопическом количестве (до нескольких нанограмм) и проводить диагностику на любой стадии инфекционного процесса.

Среди видов ДНК-анализа ПЦР-технологии (PCR) занимают ведущее место в диагностике фитопатогенов [5].

При видовой идентификации ПЦР-анализ дополняется наиболее точным и информативным методом – секвенированием. Данная технология позволяет производить идентификацию на уровне штаммов. На основании секвенирования видоспецифических локусов ДНК проведена идентификация широкого спектра фитопатогенных организмов [6–8], информация

о которых представлена в международном Генном банке NCBI [9].

В настоящее время в лесном хозяйстве Беларуси отсутствуют данные о возможности распространения насекомыми возбудителей грибных инфекционных заболеваний в питомниках, что не позволяет в должной мере обеспечивать выявление и мониторинг потенциальных источников инфекции и, соответственно, осуществлять контроль эффективности проведения профилактических и карантинных мероприятий.

**Основная часть.** Объектом исследований являлись фитопатогенные грибы, вызывающие заболевания посадочного материала в лесных питомниках.

Сбор экспериментального материала проводился в лесных питомниках Быховского и Могилевского лесхозов Могилевского ГПЛХО, Калинковичского, Мозырского и Светлогорского лесхозов Гомельского ГПЛХО. Экспериментальный материал был представлен 20 видами насекомых из четырех отрядов: Перепончатокрылые (*Hymenoptera*), Двукрылые (*Diptera*), Жесткокрылые (*Coleoptera*), Полу-жесткокрылые (*Hemiptera*) в общем количестве 200 образцов.

Для определения спектра фитозаболеваний были собраны образцы пораженных семян ели европейской (*Picea abies* L., Karst.), сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.), туи западной (*Thuja occidentalis* L.), пихты сибирской (*Abies sibirica* L.), лиственницы европейской (*Larix decidua* Mill.) в общем количестве 200 образцов. Экспериментальный материал растений был представлен фрагментами вегетативных органов с разной степенью поражения.

План работы включал следующие этапы: проведение видовой идентификации фитопатогенов в пораженном посадочном материале и выявление фитопатогенных грибов у насекомых методами ДНК-анализа; сравнительный анализ фитопатогенных грибов, выявленных у насекомых и растений.

Методика исследования основана на использовании различных методов ДНК-диагностики, включая проведение секвенирования локусов фитопатогенов [10].

На первом этапе выделялась суммарная ДНК из насекомых согласно СТАВ-методу. Тело каждого насекомого помещалось в центрифужную пробирку типа «Eppendorf» объемом 1,5 мл, содержащую 400 мкл экстрагирующего буфера следующего состава: 2%-ный р-р бромида цетилтриметиламмония (СТАВ); 0,1 М р-р трис; 1,4 М р-р хлорида натрия; 20 мМ р-р трилона Б (EDTA). Далее, используя прокаленные стеклянные пестики, производилась гомогенизация материала при комнатной температуре в

течение 30–40 с. По окончании гомогенизации пробирка с растертыми тканями встряхивалась на вихревом смесителе ( $400\text{--}600\text{ мин}^{-1}$ ) в течение 5 с. Затем пробирки инкубировались в твердотельном термостате в течение 10 мин при  $65^{\circ}\text{C}$ . Для дальнейшей работы с чистым супернатантом проводилось осаждение крупных остатков тканей центрифугированием при  $13\ 000\times g$  в течение 5 мин.

Для очистки гомогената к отобранному супернатанту добавлялся хлороформ в объемном соотношении 1 : 1. Содержимое перемешивалось на шейкере ( $1000\text{ мин}^{-1}$ ) в течение 20 мин при комнатной температуре. Далее производилось центрифугирование при  $13\ 000\times g$  ( $T = 18\text{--}20^{\circ}\text{C}$ ) в течение 20 мин. По окончании центрифугирования осуществлялось осаждение ДНК. Для этого к отобранному супернатанту добавлялся охлажденный изопропанол в объемном соотношении 1 : 0,7 соответственно и пробирки оставались на 10 мин при комнатной температуре. Содержимое пробирок центрифугировали при  $13\ 000\times g$  ( $T = 24^{\circ}\text{C}$ ) в течение 10 мин. Полученный осадок ДНК дважды промывался 70%-ным этанолом, охлажденным до температуры  $-10^{\circ}\text{C}$ . Затем пробирки высушивались до полного испарения спирта и осадок растворялся в 20 мкл бидистиллированной воды.

Аmplификация видоспецифичных регионов рибосомальной ДНК грибов проводилась методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием смеси PCR Green Mix (2X) (Fermentas, Литва) и праймеров ITS1 (TCGGTAGGTGAACCTGCGG), ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) [11] согласно протоколу фирмы-изготовителя.

В качестве области амплификации был выбран регион рибосомальной ДНК, включающий 18S рРНК, ВТС1, 5,8S рРНК, ВТС2, 28S рРНК локусы. Анализ ампликонов производился путем электрофоретического фракционирования в 1,5%-ном агарозном геле с последующим окрашиванием бромистым этидием.

Основными критериями диагностики фитопатогенов являлись количество и размер выявляемых ампликонов. Следует отметить, что длина и структура изучаемого локуса рДНК является для каждого вида грибов величиной специфичной и постоянной [12].

Для последующей видовой идентификации анализируемые ПЦР-зоны 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 Генном банке NCBI [9].

В ходе ПЦР-анализа, направленного на выявление в тканях насекомых грибной ДНК, был получен электрофоретический спектр ампликонов, характеризующийся наличием ряда фракций различной интенсивности в диапазоне от 520 до 2000 пар нуклеотидов. При этом наряду с преобладающими вариантами ампликонов в ряде образцов отмечалось дополнительное присутствие нескольких минорных фракций, что указывало на наличие в данных пробах одновременно доминирующих и нескольких сопутствующих, представленных в следовых количествах видов.

Все альтернативные варианты ампликонов были отобраны для проведения секвенирующей реакции.

По результатам секвенирования ампликонов, выявленных в исследуемых образцах насекомых, были получены следующие данные.

В Калинковичском лесхозе у 85% образцов насекомых выявлен гриб из рода *Cladosporium*, близкий по генетической структуре на 98% с *Cladosporium cladosporioides* (Fresenius) de Vries. Данный вид присутствовал в образцах представителей всех четырех исследуемых отрядов: Перепончатокрылые, Двукрылые, Жесткокрылые, Полужесткокрылые. Идентифицированный гриб является возбудителем кладоспориоза (оливковой плесени) широкого спектра лесных и сельскохозяйственных видов, поражает растение на всех этапах онтогенеза.

В единичных случаях у представителей отряда Двукрылые выявлен гриб *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl., являющийся возбудителем альтернариоза (сухой пятнистости) многих видов растений (рис. 1).

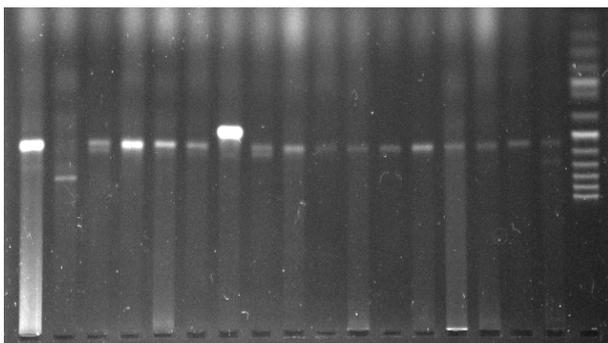


Рис. 1. Фрагмент ПЦР-спектра образцов микромицетов, выделенных у насекомых (Калинковичский лесхоз)

В Мозырском лесхозе у 60% образцов насекомых отмечалось наличие ДНК другого вида *Cladosporium*. Данный гриб доминировал у представителей отрядов Жесткокрылые и Полужесткокрылые. В 17% случаев был выявлен гриб *Alternaria sp.*, идентифицированный преимущественно у насекомых отрядов Двукры-

лые и Жесткокрылые (рис. 2). В Светлогорском, Быховском и Могилевском лесхозах практически у всех образцов (в 85–90% случаев) были выявлены грибы рода *Cladosporium*. При этом в Светлогорском лесхозе, по данным международного Генного банка NCBI, идентифицированный вид на 99% генетически идентичен с *Cl. cladosporioides*. В Быховском и Могилевском – на 98% с *Cl. cladosporioides* и *Cl. herbarum* (Pers.) Link. (рис. 3).

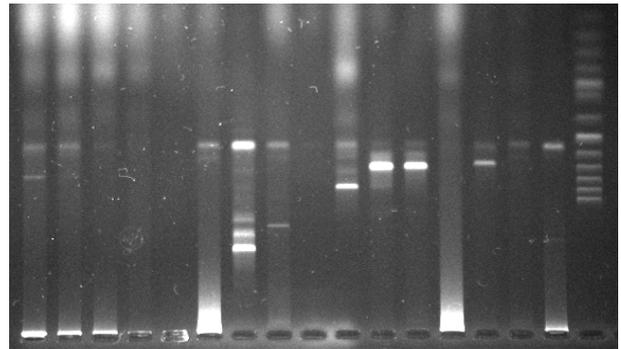


Рис. 2. Фрагмент ПЦР-спектра образцов микромицетов, выделенных у насекомых (Мозырский лесхоз)

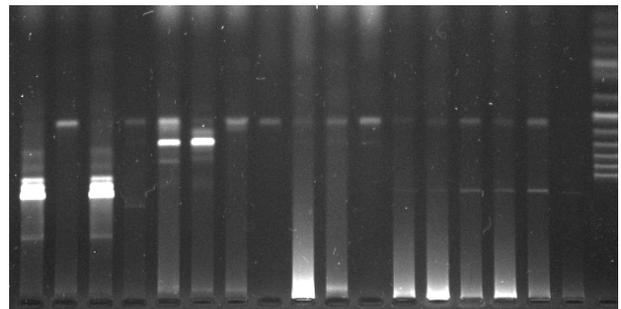


Рис. 3. Фрагмент ПЦР-спектра образцов микромицетов, выделенных у насекомых (Могилевский лесхоз)

Необходимо отметить, что в препаратах суммарной ДНК, выделенной из насекомых, выявились фракции ампликонов в диапазоне от 650 до 800 п. н., отличные от генетического материала грибов. Проведенная молекулярно-генетическая идентификация показала их принадлежность к ряду травянистых видов. По всей вероятности, это связано с наличием пыльцы, переносимой насекомыми.

На следующем этапе исследования был проведен ДНК-анализ микрофлоры пораженных тканей хвои сеянцев и саженцев ряда древесных пород, собранных в обследованных лесных питомниках.

В результате молекулярно-генетической диагностики микромицетов в образцах пораженных вегетативных органов растений был получен многофракционный электрофоретический

спектр, характеризующийся наличием фракций разной длины и интенсивности. При этом в большинстве образцов отмечалось одновременное присутствие генетического материала двух и более видов грибов.

По результатам секвенирования альтернативных вариантов ампликонов грибов, в Калининском, Мозырском и Светлогорском лесхозах Гомельского ГПЛХО на пораженных сеянцах и саженцах сосны и ели были выявлены следующие доминирующие фитопатогены: *A. alternata*; *Cl. cladosporioides*; *Cladosporium sp.*; *Sclerophoma pithyophila* (Corda) v. Hohn. – возбудитель склерофомоза хвойных. Данный вид поражает преимущественно молодые растения и в условиях Беларуси является карантинным объектом; *Rhizoctonia solani* J. G. Kuhn – возбудитель ризоктониоза (окаймленной пятнистости) ряда лесных и сельскохозяйственных растений; *Phoma macrostoma* Mont. и *Phoma sp.* – возбудители фомоза (сухой гнили) широкого спектра растительных видов (рис. 4).

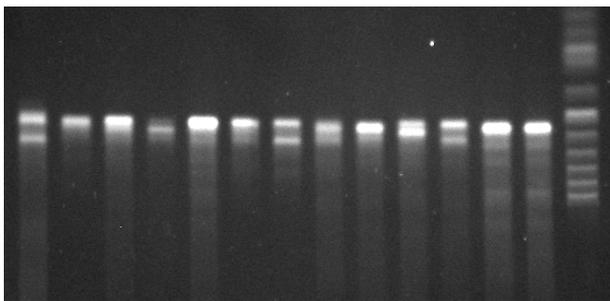


Рис. 4. Фрагмент ПЦР-спектра образцов микромицетов, выделенных из пораженной хвои сеянцев (Мозырский лесхоз)

В Могилевском и Быховском лесхозах Могилевского ГПЛХО в пораженном растительном материале ели, сосны и туй были выявлены *Cl. herbarum*, *Alternaria sp.*, *Scl. pithyophila*, а также *Episcoccum nigrum* Link – возбудитель пятнистости хвои и листьев ряда растительных видов, и почвенный дрожжеподобный гриб *Rhodotorula sp.*, часто встречающийся на мертвых растительных остатках (рис. 5).

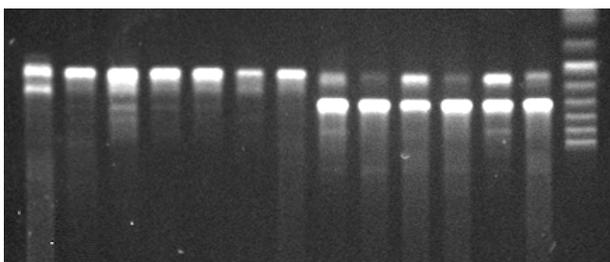


Рис. 5. Фрагмент ПЦР-спектра образцов микромицетов, выделенных из пораженной хвои сеянцев (Быховский лесхоз)

Сравнительный анализ видового состава фитопатогенных грибов в образцах насекомых и растений показал, что пять из двенадцати выявленных в посадочном материале видов, относящихся к двум родам, – *Cladosporium* и *Alternaria*, присутствуют у насекомых, обитающих на территории лесных питомников. Следует отметить, что данные виды встречались в значительном количестве особей насекомых (до 85% случаев). Наличие данных фитопатогенных грибов у насекомых позволяет сделать вывод, что насекомые являются одним из потенциальных факторов переноса возбудителей ряда фитозаболеваний посадочного материала, в частности альтернариоза и кладоспориоза, в лесных питомниках.

**Заключение.** Проведенное исследование показало, что насекомые являются одним из потенциальных факторов переноса и распространения ряда возбудителей заболеваний древесных видов в лесных питомниках. Среди выявленных у насекомых фитопатогенных грибов доминировали виды родов *Cladosporium* и *Alternaria*. Данное явление можно объяснить рядом причин.

В связи с тем, что названным грибам в процессе размножения присуще сухое рассеивание спор, открытые пространства, такие, как питомники, способствуют их распространению. Являясь космополитами, споры данных видов в сравнении с другими грибами занимают главенствующее положение в массовом расселении различными путями и достигают высокой концентрации в воздухе. Данному процессу также способствует постоянное спороношение *Cladosporium spp.* и *Alternaria spp.*, происходящее в течение всего вегетационного периода.

Благодаря микроскопическим размерам (1–20 мкм), наличию шероховатой споровой оболочки и структур в виде шипиков споры легко задерживаются на поверхности растительных тканей и частей тела насекомых. В случае других хозяйственно важных фитопатогенных грибов со слизистым покрытием споровой оболочки, например видов рода *Phoma*, – основное распространение спор протекает в условиях повышенной влажности, в частности, при выпадении осадков, когда активность ряда насекомых снижена и, следовательно, вероятность переноса ими спор является низкой [1]. Массовое распространение инфекции также во многом зависит от совпадения периодов спороношения грибов и лета насекомых.

Выявление генетического материала грибов в пищеварительном тракте насекомых можно объяснить как случайным попаданием биологического материала грибов с растительной пищей, так и непосредственным использованием

насекомыми грибов в качестве источника питания. В дальнейших исследованиях планируется установить видовые ассоциации патоген – насекомое, а также определить пути переноса насекомыми фитопатогенных грибов (на наружных покровах или пищеварительном тракте).

### Литература

1. Воронцов, А. И. Лесная энтомология: учебник / А. И. Воронцов. – 4-е изд., перераб. и доп. – М.: Высш. шк., 1982. – С. 91–149.
2. Fungi Vecteded by the Bark Beetle *Ips tyrographus* Following Hibernation Under the Bark of Standing Trees and in the Forest Litter / Y. Persson [et al.] // *Fungal Microbiology*. – 2009. – Vol. 58 – P. 651–659.
3. Epitypification of *Ophiostoma galeiforme* and phylogeny of species in the *O. galeiforme* complex / X. Zhou [et al.] // *Mycologia*. – 2004. – Vol. 96, No. 6. – P. 1306–1315.
4. Insects and other arthropods as agents of vector-dispersal in fungi [Electronic resource] / S. P. Abbott. – 2002. – P. 1–5. Mode of access: <http://www.thermapure.com/pdf/AbbottInsectdispersal.pdf>. – Date of access: 14.09.2011
5. Stammler, K. Detection and Identification of *Phytophthora* Species in Southern Italy by RFLP and Sequence Analysis of PCR-amplified Nuclear Ribosomal DNA / K. Stammler // *European Journal of Plant Pathology*. – 1993. – Vol. 113, No. 1. – P. 1–14.
6. Ahonsi, M. O. Development of SCAR markers and PCR assays for single or simultaneous species-specific detection of *Phytophthora nicotianae* and *Pythium helicoides* in ebb-and-flow irrigated kalanchoe / M. O. Ahonsi, Y. Ling, K. Kageyama // *Journal of Microbiological Methods*. – 2010. – Vol. 83, No. 2. – P. 260–265.
7. A rapid PCR-RFLP method for monitoring genetic variation among commercial mushroom species / P. Martin [et al.] // *Biochemistry and Molecular Biology Education*. – 2004. – Vol. 32, No. 6. – P. 390–394.
8. Intraspecific and within-isolate sequence variation in the ITS rRNA gene region of *Pythium mercuriale* sp. nov. (*Pythiaceae*) / L. Belbahri [et al.] // *FEMS microbiology*. – 2008. – Vol. 284, No. 1. – P. 17–27.
9. National Center for Biotechnological Information, NCBI [Electronic resource]. – Mode of access: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. – Date of access: 14.09.2011.
10. Падутов, В. Е. Методы молекулярно-генетического анализа / В. Е. Падутов, О. Ю. Баранов, Е. В. Воропаев. – Минск: Юнипол, 2007. – 176 с.
11. 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.
12. Baranov, O. Yu. Genetic identification of fungi colonizing seedlings of 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). – P. 61–64.

Поступила 01.03.2012