

УДК 630*165.3

Е. В. Лесик, младший научный сотрудник (РУП «Институт защиты растений»);
О. Ю. Баранов, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник,
(Институт леса НАН Беларуси)

ВИДОСПЕЦИФИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ЛОКУСОВ рДНК ФИТОПАТОГЕННЫХ ГРИБОВ РОДА *MONILINIA*

Объектом молекулярно-генетических исследований явились изоляты патогенных грибов рода *Monilinia*, собранные из различных регионов Беларуси. В ходе работы, на основании секвенирования ВТС1 – 5,8S рРНК – ВТС2 региона рДНК, была проведена видовая диагностика изученных изолятов патогенных грибов. Молекулярно-генетическими методами идентифицированы виды *Monilinia fructigena* и *Monilinia laxa* в патогенном комплексе монилиальных грибов, поражающих деревья *Malus* × *spp.*

The object of molecular genetic studies were isolates of pathogenic fungi *Monilinia*, collected from different regions of Belarus. The work, based on the sequencing ITS1 – 5.8S rRNA – ITS2 region of rDNA, was performed a species identification of studied isolates of pathogenic fungi. Molecular genetic methods identified species *Monilinia fructigena* and *Monilinia laxa*, in pathogen complex monilial fungus affecting trees of *Malus* × *spp.*

Введение. Фитопатогенные микромицеты из рода *Monilinia* (анаморфа *Monilia*) паразитируют преимущественно на растениях из семейства *Rosaceae* и *Ericaceae*, вызывая плодовую гниль, усыхание побегов, соцветий и ветвей [1].

На яблоне наиболее распространенными и наносящими экономически значимый вред являются 3 вида: *Monilinia fructigena* (Aderh. et Ruhland) Honey, *Monilinia laxa* (Aderh. et Ruhland) Honey и *Monilinia fructicola* (Wint.) Honey. Гриб *M. fructigena* широко распространен в Европе и специализируется в основном на поражении плодов яблони, однако может также вызывать монилиальный ожог соцветий, завязей и усыхание побегов и плодовых образований. Вид *M. laxa* распространен в различных экологических условиях и встречается практически во всех зонах выращивания семечковых и косточковых культур. Патоген специализируется на поражении косточковых культур, вызывая монилиальный ожог и плодовую гниль. Однако в последнее время появились данные о встречаемости патогена и на семечковых культурах [2, 3]. Третий вид – *M. fructicola* впервые обнаружен в Америке, Австралии и Новой Зеландии и является карантинным объектом для стран Европы. В последние годы, по данным европейских исследователей, во Франции, Австрии, Словакии и Венгрии зарегистрированы случаи ввоза патогена с импортируемой продукцией плодовых культур. Возбудитель болезни поражает преимущественно косточковые культуры, но может встречаться и на яблоне [4].

Для диагностики грибов рода *Monilinia* применяют в основном классические микробиологические методы. За рубежом такие исследования проводятся достаточно широко, в том числе разработано несколько ключей для определения видов *M. fructigena*, *M. laxa* и

M. fructicola на основе культурально-морфологических признаков [2, 5]. В то же время некоторые авторы считают, что данные ключи не полностью способны различать анализируемые виды [1, 2]. К тому же проведение таких исследований требует значительных затрат времени. Поэтому кроме трудоемких и не всегда надежных микробиологических методов для дифференциации видов монилиальных грибов используют методы молекулярной диагностики [6]. В настоящее время разработаны наборы видоспецифичных праймеров для быстрой и точной идентификации видов рода *Monilinia*, что особенно актуально для диагностики карантинного вида *M. fructicola* [3, 4]. С внедрением методов молекулярной биологии в микологию появились новые возможности для исследования экологии генетики, популяционной биологии и вредоносности грибов. Использование молекулярно-генетических методов позволяет выявлять различия между имеющимися видами на генетическом уровне. Так, в 2002 г. на основании генетических исследований венгерскими биологами был обнаружен еще один возбудитель монилиоза яблони – гриб *Monilia polystroma*. Этот патоген генетически наиболее близок виду *M. fructigena* и способен вызывать монилиальный ожог побегов яблони и монилиальную гниль плодов при их искусственном заражении [3].

В Беларуси исследования распространенности и видового состава монилиальных грибов на яблоне проводились в 70–80-е годы прошлого столетия. По данным отечественных исследователей того времени, в садах республики монилиоз яблони вызывал один вид грибов из рода *Monilinia* – *M. fructigena* [7]. Однако в последние годы в Беларуси, в связи с существенным изменением технологии выращивания са-

дов, обновлением промышленного сортимента яблони, а также с изменением агроклиматической ситуации в сторону потепления, наблюдается изменение фитосанитарной ситуации в яблоневых садах, что повлияло на усиление вредоносности монилиоза яблони и изменение биологии возбудителя болезни. Кроме того, появление в странах Европы новых видов монилиальных грибов, в том числе карантинного вида *M. fructicola*, обуславливает необходимость уточнения вопроса по видовому составу возбудителей монилиоза яблони в садах Беларуси и оценки новых методов их идентификации.

Исходя из всего вышесказанного, целью данной работы явилось изучение особенностей нуклеотидной структуры локусов рДНК выявляемых изолятов возбудителей монилиоза с целью проведения видовой идентификации.

Основная часть. Материал для анализа был собран с растений яблони, характеризующихся соответствующей симптоматикой в течение 2008–2012 гг. в ходе маршрутных обследований садов в различных регионах республики.

Выделение изолятов грибов в чистую культуру проводили из пораженных монилиозом плодов, соцветий, завязей и побегов яблони. Изоляты культивировали на картофельно-декстрозном агаре (КДА) при +22,0°C. В дальнейших исследованиях использовали моноспорные изоляты грибов. Предварительно видовую принадлежность выделенных штаммов определяли с помощью синоптического ключа различий С. Р. Лана (Lane, 2002) на основании культурально-морфологических свойств, включающего 7 характеристик: цвет колонии, скорость роста, интенсивность споруляции, наличие концентрических кругов споруляции, описание края колонии, наличие розеточности в росте, наличие темных дуг и колец [2].

Выделение ДНК производилось из фрагментов мицелия культур *in vitro* СТАВ-методом [8]. 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 [9], фланкирующих регион рДНК: ВТС1 – 5,8S рНК – ВТС2. Электрофоретическое фракционирование ампликонов выполнялось в 1%-ном агарозном геле High Efficiency of Separation (Pharmacia Biotech) с целью эффективного их разделения и типировки. Для видовой идентификации грибов анализируемые ПЦР-продукты 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 струк-

тура секвенированных ампликонов грибов анализировалась с помощью программы BLAST в GenBank NCBI [10].

По результатам микробиологической диагностики большинство изолятов, выделенных в 2008–2012 гг. из пораженных монилиозом образцов яблони, относятся к виду *M. fructigena*. Однако в 2011 г. в трех садах Минской области нами были обнаружены пораженные монилиозом образцы плодов и кольчаток яблони с симптомами, не характерными для заражения грибом *M. fructigena*. Выделенные в чистую культуру изоляты гриба по совокупности культуральных признаков и размеру конидий были идентичны грибу *M. laxa*. В то же время, по литературным данным отечественных исследователей, этот патоген в условиях Беларуси способен поражать только косточковые культуры [7]. Вместе с тем необходимо отметить, что некоторые исследователи указывают на наличие специализированной формы *M. laxa f. sp. mali*, способной поражать только яблоню [6].

Грибы *M. fructigena* и *M. laxa* являются близкородственными видами, схожими по своим морфологическим и биологическим особенностям. Проведенная диагностика в условиях *in vitro* с помощью синоптического ключа различий Лана показала, что не все анализируемые изоляты удалось идентифицировать до вида. Некоторые из них по совокупности культурально-морфологических признаков могли быть отнесены к тому или иному виду условно, поскольку комплекс признаков, свойственный какому-либо виду, присутствовал у них не полностью или встречались признаки, не характерные для данного вида.

Дополнительным способом диагностики фитопатогенных грибов являются методы молекулярной генетики, позволяющие в большинстве случаев разрешать спорные вопросы, возникающие при использовании традиционных микробиологических методов определения видовой принадлежности грибов, которые и были использованы в дальнейшей работе.

Для молекулярного анализа были взяты два штамма гриба, предварительно идентифицированного нами как *M. laxa* (М1х-4 и М1х-12, выделенных из пораженного плода и кольчатки яблони), и один штамм гриба *M. fructigena* (Сп-4-с), выделенного из пораженного монилиозом побега яблони.

На первом этапе анализа была проведена оценка чистоты анализируемых культур изолятов – отсутствием загрязненности другими видами грибов. С данной целью был проведен первичный анализ ПЦР-спектров, с учетом количества и размера выявляемых ампликонов изучаемого региона рДНК. Длина данного ло-

куса рибосомальной ДНК является для грибного вида величиной постоянной, что в определенной степени можно использовать в качестве первичного диагностического признака видовой идентификации.

В ходе проведенного ДНК-анализа изолятов в каждом из образцов выявлены четкоокрашенные однофракционные спектры, что указывало на отсутствие примесей других видов грибов.

При этом следует отметить, что размер амплифицированных зон для каждого из образцов составил ≈ 538 п. о., что указывало на близкое родство или видовую идентичность изолятов. В тоже время анализ кривых плавлений выявил сходство термодинамических характеристик только двух изолятов М1х-4 и М1х-12 (84,25°C) и альтернативные значения T_m для Сп-4-с (84,56°C).

В ходе сопоставления результатов секвенирования ВТС1 – 5,8S рРНК – ВТС2 региона была выявлена 100%-ная гомология образцов М1х-4 и М1х-12 и 97%-ная их гомология с изолятом Сп-4-с. При этом следует отметить, что все выявленные различия были связаны только с нуклеотидными заменами в ITS1 и ITS2 локусах. Также отличительным фактом являлась тенденция замены А–Т пар у изолятов М1х-4 и М1х-12 на G–C у образца Сп-4-с. Наибольшая межвидовая гетерогенность в нуклеотидной структуре выявлена в последовательности ITS2 локуса, что характерно для большинства аскомицетных грибов.

Проведенная видовая идентификация в Генном банке NCBI и базе данных фитопатогенов ГНУ «Институт леса НАН Беларуси» образцов М1х-12 и М1х-4 выявила их 100%-ное совпадение с депонированными образцами *M. laxa* (EU042149.1, EF153017.1, AF150676.1 и др.). Наибольшая гомология с депонированными изолятами *M. fructicola* не превысила 99%, *M. fructigena* – 97%.

Анализ нуклеотидной последовательности образца Сп-4-с выявил 100%-ную гомологию с представленными секвенированными регионами рДНК изолятов *M. fructigena* (EF207429.1, AF150678.1, AF150677.1 и др.). Наибольшая гомология с образцами *M. laxa* и *M. fructicola* не превысила 97%.

Заключение. Таким образом, проведенные исследования показали возможность проведения видовой идентификации грибов рода *Monilinia* на основании секвенирования локусов рибосомальной ДНК, различия которых были связаны с нуклеотидными заменами в ВТС2 локусе рДНК.

Методом секвенирования подтверждена видовая принадлежность гриба, ранее иденти-

фицированного нами как *M. laxa*, в патогенном комплексе монилиальных грибов, поражающих яблоню.

Литература

1. Бильдер, И. В. Видовое разнообразие грибов рода *Monilinia* на плодовых культурах / И. В. Бильдер // Вестник защиты растений. – 2007. – С. 94–100.
2. Lane, C. R. A synoptic key for differentiation of *Monilinia fructicola*, *M. fructigena* and *M. laxa*, based on examination of cultural characters / C. R. Lane // Bulletin OEPP / EPPO Bulletin. – 2002. – Vol. 32. – P. 489–493.
3. Côté, M.-J. Identification of *Monilinia fructigena*, *M. fructicola*, *M. laxa*, and *Monilia polystroma* on Inoculated and Naturally Infected Fruit Using Multiplex PCR / M.-J. Côté, M.-C. Tardif, A. J. Meldrum // Plant Disease. – 2004. – Vol. 88, № 11. – P. 1219–1225.
4. Ondejková, N. First report on *Monilinia fructicola* in the Slovak Republic / N. Ondejková, M. Hudecová, K. Bacigálová // Plant Protection Science. – 2010. – Vol. 46, № 4. – P. 181–184.
5. Van Leeuwen, G.C.M. Delineation of the three brown rot fungi of fruit crops (*Monilinia* spp.) on the basis of quantitative characteristics / G. C. M. van Leeuwen, H. A. van Kesteren // Canadian Journal of Botany. – 1998. – Vol. 76. – P. 2042–2050.
6. Genetic variation among and within *Monilinia* species causing brown rot of stone and pome fruits / C. E. Fulton [et al.] // European Journal of Plant Pathology. – 1999. – Vol. 105. – P. 495–500.
7. Онуфрейчик, Н. Г. Плодовая гниль яблони и усовершенствование химических мероприятий по борьбе с ней в восточной части Беларуси: автореф. ... дис. канд. с.-х. наук: 06.01.11 / Н. Г. Онуфрейчик; Белорус. науч.-исслед. ин-т земледелия. – Жодино, 1974. – 22 с.
8. Падутов, В. Е. Методы молекулярно-генетического анализа / В. Е. Падутов, О. Ю. Баранов, Е. В. Воропаев. – Минск: Юнипол, 2007. – 176 с.
9. White, T. J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics / T. J. White [et al.] // A Guide to Methods and Applications: PCR Protocols. – New York: Academic Press Inc. – 1990. – P. 315–322.
10. GenBank [Electronic resours] / National Center for Biotechnology Information. – Bethesda MD, USA. – Mode of access: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank>. – Date of access: 20.12.2012.

Поступила 21.01.2013