

УДК 630*232.3

Ю. М. Юсипович, инженер кафедры лесоводства (НЛТУ Украины);**В. А. Ковалева**, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник (НЛТУ Украины);**Р. Т. Гут**, доктор биологических наук, профессор кафедры лесоводства (НЛТУ Украины)

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГРАНИЦ СКРЫТОГО ЗАРАЖЕНИЯ ДЕРЕВЬЕВ В ОЧАГЕ КОРНЕВОЙ ГУБКИ В ДРЕВОСТОЕ СОСНЫ ОБЫКНОВЕННОЙ

Описан молекулярно-генетический подход к определению скрытого заражения деревьев в очаге корневой губки соснового древостоя, который базируется на полимеразной цепной реакции (ПЦР) со специфическими праймерами к *Heterobasidion annosum* s. s. Использование такого подхода позволило определить границы распространения патогена в древостое, что является важным для осуществления эффективных лесохозяйственных работ по локализации инфекции.

A molecular-genetic approach to the definition of latent lesion trees in *Heterobasidion* disease gaps in Scots pine stand which is based on the polymerase chain reaction (PCR) with specific primers to *Heterobasidion annosum* s. s. was described. This approach has allowed to determine the boundaries of the pathogen expansion in the stand and it is important for the implementation of the qualitative forestry works to localization of infection.

Введение. Одной из наиболее опасных грибных болезней сосны обыкновенной, которая захватывает большие площади древостоев и нередко приобретает характер затяжных эпифитотий, является корневая гниль, вызываемая трутовым грибом (*Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref.), иначе корневой губкой. Это заболевание приводит к массовому усыханию деревьев и распаду насаждений, что наносит значительный ущерб лесному хозяйству. Проблема поражения сосновых насаждений корневой губкой изучается уже более ста лет, но до сих пор не ясны причины чувствительности сосны к этому грибу, а разработка эффективных мер борьбы с ней осложняется особенностями биологии этого патогена, способного переходить от сапрофитного существования к паразитизму [1]. Для защиты хвойных лесов от корневой губки используются различные методы от агротехнических до микробиологических [2, 3]. Важными мерами в ограничении массового поражения хвойных древостоев корневой губкой является раннее выявление фитопатогена в древостое, определение границ скрытого очага поражения и своевременное изъятие из насаждения больных деревьев путем проведения выборочных или сплошных рубок.

Болезнь проявляется в насаждениях сосны, чаще в виде распространяющихся очагов усыхания, что приводит к началу распада древостоев в 20–40-летнем возрасте. Внешними признаками поражения деревьев корневой губкой являются: ажурность кроны, снижение прироста по высоте, пожелтение и укорачивание хвои, смолотечение, смоляные желваки на стволах проявляются не всегда. Эти признаки появляются у сосны при поражении 30–40% корней. Болезнь диагностируют также по плодовым телам гриба; по засмолению древесины; по за-

паху скипидара на ранней стадии гниения; по ситовой гнили и расслоению древесины на волокна; по характерным особенностям гниения древесины в стволах и корнях, а именно по изменению ее цвета от желтого до красновато-бурого [4].

На сегодня основным методом фитопатологического контроля лесов является визуальное обследование, возможности которого ограничены в выявлении корневой гнили на ранних стадиях развития патологического процесса из-за скрытого характера его протекания. А. Г. Булат предлагает отбирать латентно пораженные патогеном экземпляры по биоэлектрическим показателям, которые характеризуют уровень метаболизма деревьев [1]. Перспективным для определения состояния деревьев считаются показатели электропроводности прикамбиального слоя тканей. В настоящее время в сельском хозяйстве все большее распространение получают чувствительные и высокоспецифические молекулярно-генетические методы диагностики и идентификации фитопатогенов, внедрение которых в практику лесного хозяйства является актуальной задачей [5].

Целью данной работы было определить методом полимеразной цепной реакции объективные границы скрытого заражения деревьев в очаге корневой губки *Heterobasidion annosum sensu stricto* (s. s.) в древостое сосны обыкновенной.

Основная часть. Образцы древесины добывали возрастным буровом Djos 70 (Швеция) у основания ствола сосны. Радиальные керны диаметром 4–5 мм содержали древесину от коры до сердцевины дерева. Выделение ДНК из образцов проводили ЦТАБ-методом [6]. Качество выделенной ДНК проверяли спектрофотометрически (поглощение при 260/280 нм,

260/230 нм) и с помощью электрофореза в агарозном геле. Полимеразную цепную реакцию для выявления ДНК корневой губки осуществляли с помощью специфических праймеров, прямого MJ-F: 5'-GGTCCTGTCTGGCTTTGC-3' и обратного MJ-R: 5'-CTGAAGCACACSTT-GCCA-3' [12]. Реакционная смесь для ПЦР содержала 2,5 мМ MgCl₂, 0,2 мМ дНТФ (Fermentas), 0,8 рМ каждого праймера, 1 нг ДНК и 1 U TaqPol ДНК-полимеразы (Fermentas). Условия ПЦР: начальная денатурация 3 мин при 95°C и 40 циклов; денатурация при 95°C, 1 мин; отжиг при 53°C, 1 мин; элонгация при 72°C, 1 мин и после последнего цикла еще 5 мин элонгации при температуре 72°C. Продукты ПЦР разделяли в 2%-ном агарозном геле в трис-боратном буфере (50 мМ трис-Н₃ВО₃, 2 мМ ЭДТА), при напряжении 20 В/см² в течение 1 ч. Гели окрашивали бромистым этидием (1 мкг/мл), продукты визуализировали с помощью УФ-трансиллюминатора и фотографировали. Количественный расчет ДНК проводили с помощью программы GelProAnalyzer 4.0 (MediaCybernetics, США). Все эксперименты повторяли 3 раза.

Для предупреждения массового поражения древостоев корневой губкой и своевременного проведения лесохозяйственных мероприятий по борьбе с этим фитопатогеном важно еще на ранних этапах распространения гриба в насаждении выявлять и изымать пораженные мицелием гриба деревья. Ранее нами была разработана методика определения ДНК корневой губки в древесине деревьев на основе ПЦР с использованием специфических праймеров к *Heterobasidion annosum s. s.*, которая была апробирована на саженцах сосны, экспериментально инфицированных патогеном [7].

Разработанная методика использована нами для определения границ зоны скрытого заражения деревьев в очаге корневой губки. В сосновом насаждении Страдчевского учебно-производственного комбината при визуальном осмотре был обнаружен участок с усохшими и ветровальными деревьями, а также встречались экземпляры с симптомами болезни (редкой кроной и наклоненным стволом). Этот участок находился в свежем сосновом суборе (В₂), на пробной площади, размер которой составлял 48 000 м². Насаждение сосны обыкновенной искусственного происхождения (V класс возраста) расположено на склоне северной экспозиции. Чистые одноярусные сосняки с полной 0,5 и запасом древесины 250 м³/га. Почва в основном представлена тяжелой супесью с частично смытым темно-гумусным горизонтом. Данные лесорастительные условия способствуют развитию очагов корневой губки [8, 9].

При визуальном осмотре плодовые тела, по морфологическим признакам характерные для корневой губки, обнаружили на 40-летнем дереве. Кроме того, на некоторых соснах были выявлены плодовые тела еще одного опасного патогена хвойных – сосновой губки (*Phellinus pini* (Thoreet Fr.) Pil.). Данное обстоятельство сильно затрудняло определение границ распространения корневой губки в древостое по визуальным признакам поражения. Известно, что очагом инфекции корневой губки является часть насаждения, в котором наблюдается редкое, или куртинно-групповое, усыхание деревьев. Он состоит из биологического и геометрического центров очага, «окна» (зоны активного усыхания), зоны явного и скрытого заражения [10]. Условным биологическим центром распространения *H. annosum* нами был определен участок, на котором находился давний сухой сосны, расположенный на расстоянии 25 м в северо-восточном направлении от дерева, на котором найдено плодовое тело корневой губки (рис. 1). Группу усыхающих деревьев, корневая система которых, вероятно, сильно повреждена губкой, определили как зону активного усыхания («окно» очага). Границу зоны явного распространения корневой губки отметили по крайним деревьям № 6, 9, 12 с ярко выраженными симптомами болезни (наклоненный ствол, ажурная крона) и усохшим деревьям вблизи сосны № 18 на схеме (рис. 1).

Образцы отбирали из деревьев, расположенных по восьми географическим направлениям, начиная от биологического центра очага. Для диагностики были взяты деревья, растущие вблизи засохших экземпляров: визуально здоровые деревья № 1, 18, 19 и ослабленное дерево № 6. Также были взяты для анализа большие деревья № 7, 9 и 12 из зоны явного распространения корневой губки. Остальные диагностируемые деревья характеризовались отсутствием выраженных морфологических признаков болезни. Всего молекулярно-генетическая диагностика была проведена для 26 деревьев.

Известно, что корневая губка, в первую очередь, поражает корни сосны, поднимаясь выше корневой шейки по сердцевине и заболонной древесине до 1 м [10]. Из-за неравномерного распространения мицелия *Heterobasidion annosum s. s.*, анализ корней на присутствие ДНК патогена является не эффективным, поскольку существует большая доля вероятности отбора не зараженных корней [7]. Поэтому для диагностики отбирали керны древесины у основания ствола. Направление бурава к стволу под углом 90° дает возможность взять керн на высоте только 22–25 см, что обусловлено длиной ручки возрастного бурава (рис. 2, а).

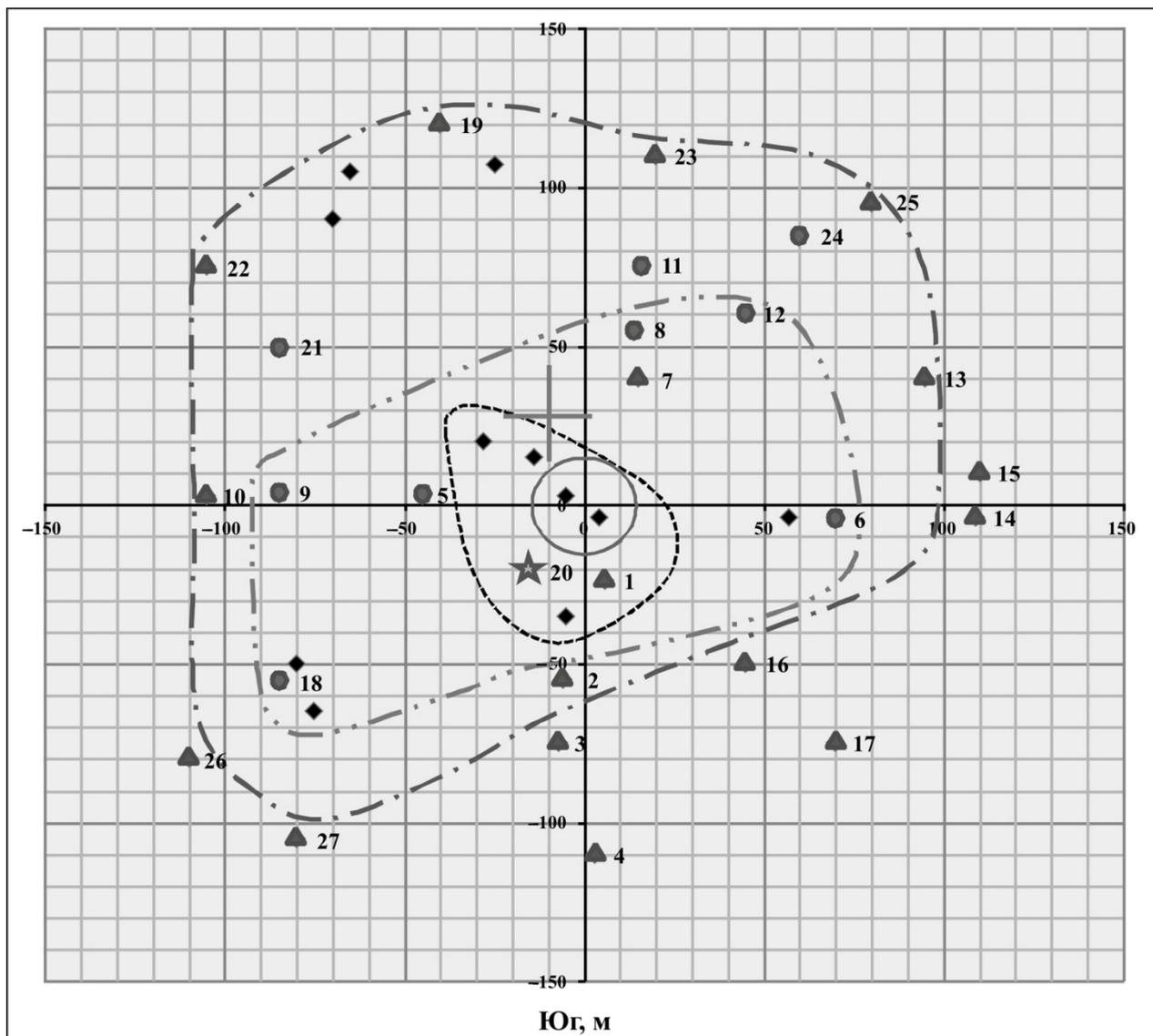


Рис. 1. Схема расположения сосновых деревьев, дигностированных на корневую губку, на пробной площади Страдчевского учебно-производственного комбината. Условные обозначения:

- ◆ – засохшие сосновые деревья; ▲ – сосновые деревья, в древесине которых не обнаружено ДНК корневой губки; ● – сосны, в древесине которых обнаружена ДНК корневой губки;
- ★ – сосна, у основания ствола которой обнаружено плодовое тело корневой губки;
- — — — — биологический центр очага поражения; — — — — — зона активного усыхания;
- · — · — зона явного распространения корневой губки; — — — — — граница скрытого заражения;
- ⊕ – геометрический центр очага корневой губки. Расстояние между деревьями выражено в метрах

Для максимального захвата из корневой шейки участков древесины, потенциально зараженных мицелием, необходимо либо сформировать углубление под ручкой бурава, либо направить бурав к стволу дерева под углом около 30° (рис. 2, б). Для предотвращения искусственного заражения деревьев спорами фитопатогенных грибов при отборе образцов сверло с поршнем дезинфицировали в этаноле, а отверстия, образованные в результате отбора древесины, закупоривали садовой замазкой (садовый вар: 50% канифоль + 50% свиной жир). Кernels хранили в холодильнике при температуре $+4^\circ\text{C}$ до выделения из них ДНК.

Мицелий гриба распространяется по стволу неравномерно, поэтому для выделения ДНК формировали суммарный образец, который содержал измельченную древесину с разных участков керна по всей его длине (рис. 3). В суммарный образец не включали древесину, сильно пропитанную смолой (коричневого цвета, рис. 3, б), поскольку она содержит высокие концентрации полифенолов, терпенов и других вторичных метаболитов, которые мешают выделению ДНК, а также ингибируют ПЦР. Древесина из таких кернов отбиралась рядом с сильно осмоленными участками.

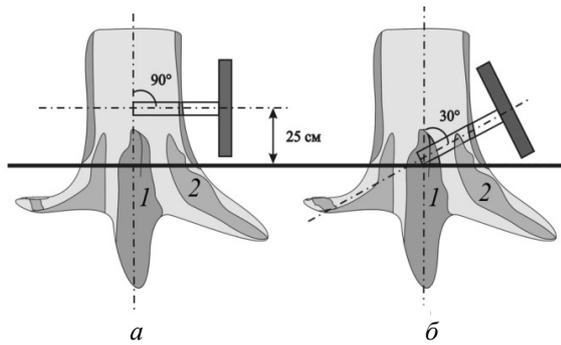


Рис. 2. Отбор кернов древесины у основания ствола сосны обыкновенной:
 а – направление бурава к стволу под углом 90°;
 б – направление бурава к стволу под углом 30°;
 1 – сердцевинное распространение мицелия;
 2 – заболонное распространение мицелия



Рис. 3. Образцы древесины, изъятые из стволов сосен на уровне корневой шейки возрастным буровом:
 а – образец древесины (кern) сосны обыкновенной без видимых поражений;
 б – образец древесины сосны обыкновенной с некротизированными и осмоленными участками:
 1 – участки древесины, отобранные для выделения ДНК; 2 – сильно осмоленные участки древесины

Поскольку на пробной площади были выявлены плодовые тела сосновой губки, то вероятно, что некоторые сосновые деревья могут быть заражены двумя видами фитопатогенных грибов. Сосновая губка распространяется по всей длине деловой древесины. Сильно осмоленная древесина керна может свидетельствовать о поражении дерева патогеном. Среди 26 изъятых для анализа кернов 16 образцов были с поврежденными и осмоленными участками. Чтобы проверить специфичность праймеров к *H. annosum s. s.*, мы провели ПЦР, используя в качестве матрицы ДНК *H. annosum s. s.* и ДНК сосновой губки (*Phellinus pini*), выделенную с плодовых тел, произрастающих на соснах изучаемой пробной площади, а также

ДНК *Heterobasidion parviporum*, выделенную из плодового тела гриба, растущего на *Picea abies* (L.) Karst.

Специфический продукт длиной 100 пар нуклеотидов (п. н.) получен в реакции только с ДНК *H. annosum* (рис. 4, дорожка 1), с ДНК других видов грибов продукты амплификации не обнаружены (рис. 4, дорожки 2, 3).

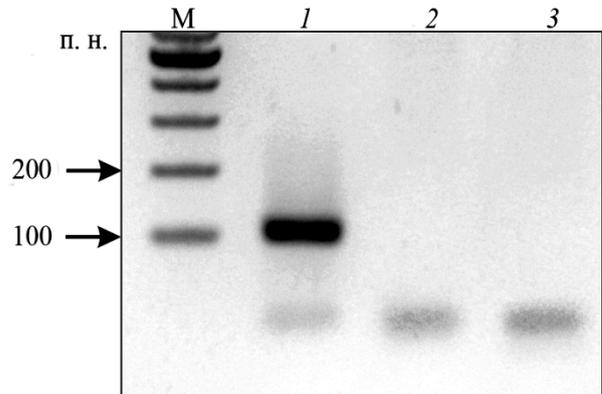


Рис. 4. Специфичность определения ДНК корневой губки методом ПЦР с геноспецифическими праймерами:
 М – маркеры 100 bp DNA LadderPlus (Fermentas);
 1 – ДНК *H. annosum s. s.*, длина амплифицированного продукта – 100 п. н.;
 2 – ДНК *Heterobasidion parviporum*;
 3 – ДНК *Phellinus pini*

Для ранней диагностики фитопатогенных грибов в образцах древесины необходима высокая чувствительность метода, т. е. определение микроколичеств ДНК патогена на фоне высокого уровня ДНК хозяина. Нами было установлено, что с помощью ПЦР и праймеров MJ-R, MJ-F можно определить $4 \cdot 10^{-3}$ пг ДНК корневой губки в реакционной смеси [7]. Такая высокая чувствительность реакции обусловлена тем, что амплифицированный фрагмент принадлежит последовательности ISR (Intergenic Spacer Region) рибосомальных генов, tandemно повторяющихся в геномах.

ПЦР-анализ отобранных образцов показал присутствие ДНК корневой губки в древесине девяти деревьев (рис. 5, дорожки 5, 6, 8, 9, 11, 12, 18, 21, 24).

Молекулярная диагностика подтвердила зараженность корневой губкой ослабленных деревьев № 6, 9, 12 из зоны явного распространения патогена. Наряду с этим, в древесине сосны № 7, на стволе которой присутствовали открытые язвенные образования с беловатым экссудатом, ДНК корневой губки не была обнаружена, что может свидетельствовать о поражении данного экземпляра другими фитопатогенами.

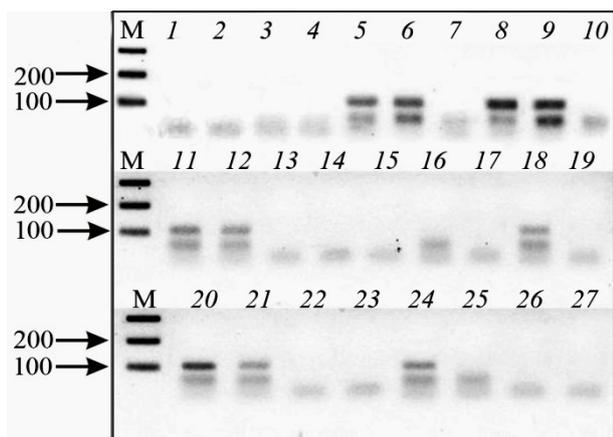


Рис. 5. Электрофореграмма продуктов амплификации суммарной ДНК, выделенной из древесины сосен, с геноспецифическими к корневой губке праймерами: М – маркеры 100 bp DNA LadderPlus (Fermentas); 5, 6, 8, 9, 11, 12, 18, 21, 24 – дорожки, которые содержат продукт длиной 100 п. н., свидетельствующий о присутствии ДНК корневой губки в древесине; 20 – ДНК плодового тела *H. annosum*, взятого с пораженной сосны; 1–4, 7, 10, 13–17, 19, 22, 23, 25–27 – дорожки, которые не содержат специфических продуктов амплификации. Нумерация дорожек соответствует нумерации деревьев

Важно отметить, что это дерево расположено в зоне высокого инфекционного фона корневой губки и отсутствие ДНК *H. annosum* в его древесине указывает на повышенный уровень устойчивости его к этому патогену по сравнению с соснами № 8, 12, произрастающими рядом с ним. Возможно, резистентность этого экземпляра обусловлена его генотипическими характеристиками, но не исключено, что в данном случае можно говорить об индуцированной системной устойчивости к корневой губке, вызванной инфицированием другим микроорганизмом. О формировании системной устойчивости свидетельствует сильное осмоление кернов, взятых у основания ствола, существенно ниже язвенного поражения.

Инфицированными корневой губкой оказались визуально здоровые сосны № 5, 8, 18, произрастающие в зоне явного распространения патогена. В то же время в аналогичном дереве № 1, расположенном в зоне активного усыхания, вблизи засохших сосен, ДНК корневой губки не обнаружено. Возможно, что данный экземпляр обладает высокой степенью устойчивости к этому патогенному грибу. Такие генотипы сосны являются ценными экземплярами для использования их в селекционной работе и для изучения механизмов устойчивости сосны к корневой губке. ДНК *H. annosum s. s.*

не было обнаружено и в дереве № 19, хотя сильное осмоление древесины указывает на его инфицирование, возможно, сосновой губкой, поскольку на усохших вблизи него соснах обнаружены в большом количестве плодовые тела *Phellinus pini*. В кернах древесины из визуально здоровых деревьев № 11, 21, 24, растущих на расстоянии 60–70 м от биологического центра очага, была диагностирована ДНК патогена. Эти сосны относятся к категории деревьев со скрытым течением инфекционного процесса. Остальные деревья № 2–4, 10, 13–17, 22, 23, 25–27, взятые для анализа в направлении здорового древостоя, не содержали в древесине ДНК *H. annosum* (рис. 5). Как видно из рис. 1, распространение корневой губки в сторону юго-восточной части древостоя не произошло (деревья № 2, 3, 4, 16, 17), что связано, по-видимому, с возвышением рельефа местности в этом направлении и преобладанием легкого супесчаного грунта.

Схему размещения анализируемых деревьев на пробной площади составляли на основе измерения расстояний между деревьями и их размещения относительно сторон горизонта, эти данные переведены в систему координат. Согласно М. И. Оныськиву, границу зоны скрытого поражения определяют, отступив от края «окна» на расстоянии 5–6-ти радиусов крон средних деревьев [10]. Границу зоны скрытого заражения мы определяли, основываясь на результатах молекулярно-генетической диагностики, и ориентирами служили наиболее удаленные от центра очага инфицированные деревья, от которых отступали на расстояние 6-ти радиусов средних крон деревьев в сторону здорового насаждения (рис. 1). Такое определение зоны скрытого заражения связано с тем, что обнаружение в корневой шейке сосны ДНК *H. annosum* свидетельствует о чувствительности данного дерева к этому патогену, что обуславливает дальнейшее прогрессирование инфекции от зараженного дерева к здоровому древостою по корневым системам. Распространение инфекции в древостое зависит от особенностей строения рельефа, который способствует стоку почвенных вод или препятствует контакту корневых систем, от структуры почвы и ее влажности, а также от индивидуальной чувствительности деревьев к поражению корневой губкой [11].

Заключение. Таким образом, определение ДНК корневой губки в древесине деревьев дало возможность установить скрытые границы распространения фитопатогенного гриба в сосновом насаждении. Составленная схема позволяет рационально спланировать направление санитарных рубок, изымая при этом пораженные деревья и сохраняя здоровые. Апробированная

методика дает возможность определить корневую губку в древесине визуально здоровых сосен, оценить санитарное состояние отдельных деревьев, что, в свою очередь, позволит принять своевременные меры по сохранению товарности древесины от дальнейшего разрушения, а также объективно определить границы очага заражения.

Литература

1. Булат, А. Г. Особенности поражения корневой губкой сосновых насаждений Харьковщины и мероприятия по профилактике болезни: авторефер. дис. ... канд. с.-х. наук / А. Г. Булат. – Харьков: НДЛГА, 2006. – 21 с.
2. Сухомлин, М. М. Биологическая защита леса от корневой губки / М. М. Сухомлин // Проблемы рационального использования социально-экономического и природно-ресурсного потенциала региона: тез. докл. респ. науч.-практ. конф. – Луцк, 1993. – Ч. 1. – С. 151–152.
3. Полещук, Ю. М. Обоснование системы мероприятий по интегрированной защите сосновых насаждений от болезней / Ю. М. Полещук // Труды БГТУ. Сер. I, Лесное хоз-во. – 1999. – Вып. VII. – С. 31–34.
4. Рекомендации по защите хвойных пород от корневой губки в лесах европейской части России / сост. Е. В. Кобец; Всерос. науч.-исслед. ин-т лесоводства и механизации лесного хоз-ва. – Пушкино: ВНИИЛМ, 2001. – 16 с.
5. Молекулярно-генетическая диагностика грибных болезней в лесных питомниках / О. Ю. Баранов [и др.] // Лесное и охотничье хозяйство. – 2012. – Вып. 6. – С. 21–29.
6. Гут, Р. Т. Сравнительный анализ разных методов выделения ДНК с хвои сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) / Р. Т. Гут, Ю. В. Вербовица // Науч. вестник НЛТУ Украины: сб. науч.-техн. тр. – Львов: НЛТУ Украины, 2005. – Вып. 15.5. – С. 116–121.
7. Юсипович, Ю. М. Диагностика корневой губки (*Heterobasidion annosum* s. str.) путем полимеразно-цепной реакции / Ю. М. Юсипович, В. А. Ковалева, Р. Т. Гут // Науч. вестник НЛТУ Украины: сб. науч.-техн. тр. – Львов: НЛТУ Украины, 2012. – Вып. 22.6. – С. 43–49.
8. Павлов, И. Н. К вопросу образования очагов куртинного усыхания сосны обыкновенной на старопашотных землях (роль корневой губки, эдафических факторов и изменения климата) / И. Н. Павлов, О. А. Барабанова, С. С. Кулаков // Хвойные бореальной зоны. – 2010. – Вып. XXVII, № 3–4. – С. 263–272.
9. Шевченко, С. В. Лесная фитопатология: учеб. пособие / С. В. Шевченко. – Львов: Высшая школа, 1978. – 320 с.
10. Оныськив, М. И. Способы борьбы с корневой губкой в сосновых культурах Полесья / М. И. Оныськив, М. М. Билоус // Научные труды Лесной академии наук Украины: сб. науч. тр. – Львов: РВВ НЛТУ Украины, 2010. – Вып. 8. – С. 69–72.
11. Кузнецов, И. В. Экологические особенности корневой губки в насаждениях сосны обыкновенной Среднего Подонья: авторефер. дис. ... канд. биол. наук / И. В. Кузнецов. – Воронеж: ВГЛА, 2005. – 18 с.
12. Hantula, J. Specific Primers for the Differentiation of *Heterobasidion annosum* (s.str.) and *H. parviporum* Infected Stumps in Northern Europe / J. Hantula, E. Vainio // *Silva Fennica*. – 2003. – Vol. 37, № 2. – P. 181–187.

Поступила 01.03.2013