

**МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ
ИЗУЧЕНИЯ ВОЗБУДИТЕЛЯ РАКА ВЕТВЕЙ СОСНЫ
SPHAEROPSIS SAPINEA (FR.) DYKO & B.SUTTON**

¹Баранов О.Ю., ¹Пантелеев С.В., ²Ярмолович В.А.,
²Азовская Н.О., ³Oszako T.

¹ГНУ «Институт леса НАН Беларуси» (г. Гомель, Беларусь)

²УО «БГТУ» (г. Минск, Беларусь)

³Forest Research Institute (Sekocin, Poland)

Sphaeropsis sapinea (Fr.) Dyko & B.Sutton – анаморфный патогенный гриб, поражающий широкий спектр хвойных видов и распространенный в умеренных климатических зонах по всему миру [1]. Заболевания, вызываемые *S. sapinea* ассоциированы с развитием различных типов симптомов, включая рак ветвей и ствола, суховершинность, окрашивание древесины, пожелтение хвои, поражение почек, гниль корневой шейки сеянцев и их полегание. Следует отметить, симптоматика болезни внутри определенного географического региона зачастую является сходной, и в тоже время отличной от проявлений заболевания в других регионах. Большинство описанных случаев эпифитотий *S. sapinea* были связаны с предшествующим длительным воздействием неблагоприятных абиотических и биотических факторов, таких как заморозки, засуха, повреждения, вызванные градом, насекомыми, высоким уровнем содержания азота в почве. Обозначение заболевания, вызываемого *S. sapinea*, было заимствовано от устаревшего названия вида – *Diplodia pinea* (Desmaz.) J. Kückx и в русскоязычной литературе определяется как диплодиоз или диплодиевый некроз [2].

Впервые *S. sapinea* был описан в 1969 году как инфекционный агент, вызывающий усыхание апикальных частей побегов сосны. Диплодиоз периодически отмечался у различных видов сосен по всему миру. В США данная инфекция достигла уровня национальной проблемы. В Европе *S. sapinea* впервые был зарегистрирован в 1988 году во Франции, где, начиная с 1993 года, эпифитотии патогена были отмечены в большом числе случаев. Продолжительная засуха 2003 года способствовала развитию эпидемии *S. sapinea* по всей Центральной Европе. За последние десять лет в связи с потеплением климата инфекция распространилась по всей северной части Европы [3].

В Беларуси первый единичный случай диплодиоза был выявлен в 1990 г., а в 2009 г. возбудитель был идентифицирован по микроскопическим признакам практически по всей республике в молодняках сосны [4].

Механизм распространения данного гриба до настоящего времени полностью не изучен - в качестве потенциальных переносчиков болезни также рассматриваются насекомые, человеческая деятельность (перенос зараженных семян, посадочного материала и пр.). Кроме того, остается неизвестной и телеоморфа *S. sapinea* [5].

Изучение генетических особенностей патогенов является перспективным с точки зрения определения источников инфекции, механизмов распространения, исчезновения и реколонизации популяций. Как известно, большинство патогенных грибов в своем жизненном цикле чередуют смену половой и бесполой стадии размножения. При этом, соотношение стадий в ходе онтогенеза, и как следствие распространение половых и бесполой спор определяют структуру популяции гриба. У большинства патогенных грибов бесполой тип размножения в жизненном цикле доминирует над половым, расселение спор ограничено расстоянием, что в совокупности определяет формирование клоновой структуры популяции на данной территории. Таким образом, популяции патогенных грибов зачастую представлены ограниченным числом различающихся генотипов, т.е. эффективный размер популяции является малым [5].

До последнего времени популяционно-генетические исследования микромицетов были ограничены имеющимися методами анализа. Развитие технологий молекулярно-генетической диагностики, и в частности ДНК-маркирования, дало возможность проводить исследования патогенных грибов на качественно новом уровне [6].

Исходя из всего вышесказанного, целью данной работы явилось изучение популяционно-генетической структуры патогенного гриба *S. sapinea* в Беларуси, и анализ пространственной структурированности генотипов в насаждениях.

Экспериментальный материал был собран на территории 17 различных лесхозов Беларуси в молодых культурах сосны, в которых были выявлены очаги диплоидоза. Для изучения распределения генотипов/клонов внутри насаждений в Негорельском учебно-опытном лесхозе была заложена пробная площадь размером 300×200 м. Сбор экспериментального материала (пораженных ветвей сосны) был произведен согласно составленной схеме из точек, равноудаленных друг от друга на расстоянии 45-50 метров.

Культуры изолятов *S. sapinea* были полученные из отдельных конидий, и культивировались на 2% мальтозном агаре (MEA) (Conda, Испания) на чашках Петри при 25 °С до последующего генетического анализа.

Выделение суммарной ДНК из микробиологических культур (мицелия) было выполнено СТАВ-методом [6]. На первом этапе исследования для подтверждения видовой принадлежности изолятов к *S. sapinea* была проведена генетическая идентификация, на основании амплификации и секвенирование региона рДНК, включающего 18S rRNA – ITS1 – 5,8S rDNA – ITS2 – 28S rRNA. ПЦР-анализ был выполнен на основании использования DreamTaq™ Green PCR Master Mix (Fermentas, Литва) при следующих параметрах реакции: начальная денатурация 5 мин. при 95 °С, последующие 35 циклов 20 сек. при 95 °С, 25 секунд при 67 °С, и 45 секунд при 72 °С, и финальная элонгация 8 мин при 72 °С. Для амплификации были использованы праймеры ITS1 и ITS4. Предварительный анализ продуктов амплификации был выполнен с помощью электрофоретического фракционирования в 2,5% агарозном геле с последующим окрашиванием бромистым этидием. Образцы, для которых были выявлены ампликоны размером ~ 580 п.н. были отобраны для последующего секвенирования. Секвенирующая реакция была выполнена на основа-

нии использования набора BigDye Terminator Sequence Kit v.1.1 (Applied Biosystems, США) согласно протокола компании-изготовителя. Электрофоретическое фракционирование проведено с помощью генетического анализатора ABI Prism 310 (Applied Biosystems, США), интерпретация результатов – программного обеспечения Sequence Analysis 5.1.1 (Applied Biosystems, США). Для установления (подтверждения) видовой принадлежности образцов, нуклеотидная структура секвенированных ампликонов была проанализирована с помощью программы BLAST в GenBank NCBI [7].

На следующем этапе исследований был проведен RAPD-анализ изолятов *S. sapinea* с подтвержденной видовой принадлежностью. Предварительный анализ 40 праймеров позволил сформировать набор из 14 олигонуклеотидов, оптимальных для *S. sapinea* - UBC-106, UBC-184, UBC-203, UBC-268, UBC-337, UBC-536, OPA-11, OPE-02, OPA-08, OPA-04, OPA-09, Oligo-85 (ATCGGTCGGTA), Oligo-94 (GGACGGGTGC), Oligo-96 (CCACGACGAT). ПЦР анализ был выполнен с использованием High-Fidelity DNA Polymerase (Праймтех, Беларусь). Условия амплификации были следующими: начальная денатурация 3 мин. при 95 °С, последующие 35 циклов 25 сек. при 95 °С, 30 секунд (зависело от типа праймера) °С, 1 мин. при 72 °С, и финальная элонгация 4 мин. при 72 °С. Температуры отжига праймеров были рассчитаны с помощью программного обеспечения GeneQuant Spectrophotometer (Amersham Pharmacia Biotech, Швеция). ПЦР-продукты были проанализированы в 1,4% агарозном геле при использовании 1×TBE буфера с последующим окрашиванием бромистым этидием. Фотодокументация гелей была осуществлена с помощью видеосистемы Image Master VDS (Amersham Pharmacia Biotech, Швеция). Амплификация RAPD локусов была проведена дважды с целью исключения артефактных зон. Для описания генотипов учитывались ярко окрашенные ампликоны размером в диапазоне 200-2000 п.о. Вычисление основных популяционно-генетических параметров выполнено с помощью программного обеспечения POPGENE v. 1.32 [8].

В ходе проведенного исследования изолятов *S. sapinea* были выявлены 58 RAPD-маркеров (в среднем 4 локуса на каждый праймер). Среди изученных локусов только 10 оказались полиморфными в исследуемых образцах. Диагностируемый полиморфизм был связан с мутациями в области отжига праймеров и изменениями размера амплифицируемых локусов.

В целом на основании анализа изолятов было определено 12 различных генотипов. При этом 9 генотипов были выявлены однократно (уникальные генотипы), 3 варианта были свойственны различным изолятам. Следует также отметить, что изоляты из каждого изученного насаждения, за исключением Негорельского лесхоза, были представлены идентичными RAPD-спектрами, т.е. идентичными генотипами.

Анализ значений аллельных частот для полиморфных локусов показал, что 6 локусов имели редкие альтернативные аллели (частота не превышала 6%), остальные локусы имели аллели с частотой встречаемости 23,5-47,0% в изученной выборке. Уровень генетического полиморфизма был также оценен на основании расчета показателей генетического разнообразия Неи [9]. Так

значение параметра общего генетического разнообразия для *S. sapinea* оказалось низким ($HT = 0,043$), и полностью соответствовало величинам, полученным для видов с бесполом типом размножения. Изменчивость внутри популяций практически полностью отсутствовала ($HS \sim 0,01$), а уровень межпопуляционных различий достигал практически 99%.

Изучение уровня генетической дифференциации изолятов выявило высокую степень варьирования значения показателя генетической дистанции НЕИ (DN) среди изученных изолятов. Так, наибольшие различия были выявлены между образцами из Лепельского лесхоза и генотипом, представленным в Бобруйском и Слуцком лесхозах, Корневской ЭЛБ, и составили 0,148, т.е. 14,8% локусов представлены альтернативными вариантами генотипов. В то же время, для ряда популяций, характеризующихся идентичными генотипами, что указывалось ранее, был определен нулевой уровень различий. В среднем значение показателя DN среди изученных изолятов не превысило 0,07.

В ходе изучения распределения генотипов/клонов внутри насаждения было выявлено два варианта генотипов, имеющих уровень генетической дифференциации равный 6,8%, что не превышает среднее значение для DN изолятов *S. sapinea* в Беларуси. В ходе исследования было установлено, что размещение клонов носит кластерный характер и соответствует эффекту основателя. В целом, полученные результаты структурированности популяции *S. sapinea* характерны для популяций грибов, размножающихся преимущественно бесполом путем.

Таким образом, в ходе проведенных исследований на основании анализа RAPD-локусов показано, что уровень генетического разнообразия *S. sapinea* является низким, что соответствует данным, полученных для грибов размножающихся преимущественно бесполом путем. Тем не менее, наличие различных комбинаций генотипов указывают на наличие процессов рекомбинации у данного вида. Анализ географического распределения генетической структуры *S. sapinea* по территории Беларуси свидетельствует о том, что, по всей видимости, данный вид не является инвазивным для нашей страны, а отсутствие данных о нем связано с отсутствием эффективных средств учета и диагностики данного патогена.

Список литературы

- 1 Bahci P.R. Peterson J.L. Enhancement of Sphaeropsis sapinea stem invasion of pines by water deficits. Plant Dis. 1985. V. 69. P. 798-799
- 2 Eldridge K.G. Significance of Diplodia pinea in plantations. Review of Applied Mycology. 1961. V. 41. P. 333-339.
- 3 Purnell H. M. Shoot blight of Pinus radiata Don. Caused by Diplodia pinea (Desm.) Kickx. Forestry Commission Bulletin. 1957. № 5. 39 p.
- 4 Ярмолович В.А., Азовская Н.О., Беломесяцева Д.Б. Диплодиоз - опасное заболевание молодых деревьев сосны. Лесное и охотничье хозяйство. 2010. № 3. С. 28-31.

5 Stanosz G.R., Swart W.J., Smith D.R. RAPD marker and isozyme characterization of *Sphaeropsis sapinea* from diverse coniferous hosts and locations. *Mycological Research*. 1999. V. 103. P. 1193-1202.

6 Падутов В.Е., Баранов О.Ю., Воропаев Е.В. Методы молекулярно-генетического анализа. Мн. 2007. 176 с.

7 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>

8 http://www.ualberta.ca/~fyeh/popgene_download.html

9 Nei M. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proc. Natl. Acad. SciUSA*. 1973. V. 70. P. 3321-3323.



УДК 630.221:630.24

ВЛИЯНИЕ ПРОХОДНЫХ РУБОК В СОСНОВЫХ НАСАЖДЕНИЯХ НА ТАКСАЦИОННЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ ДРЕВОСТОЯ

Булко Н.И., Козлов А.К., Потапенко А.М., Толкачева Н.В.

ГНУ «Институт леса НАН Беларуси»

(г. Гомель, Беларусь)

В настоящее время рубки ухода за лесом вручную практически не проводятся. При механизации процессов рубок ухода можно выделить три уровня. Для первого уровня характерна механизация отдельных процессов, чаще всего – валки деревьев, остальные операции проводятся вручную. Для второго уровня характерна комплексная механизация всего процесса рубок ухода или основных операций. Однако доля ручного труда остается значительной. Третий, наиболее высокий уровень механизированных рубок ухода связан с применением многооперационных машин, которые практически полностью заменяют ручной труд. Этот уровень требует высокой технической оснащенности предприятий. В настоящее время в Министерстве лесного хозяйства Республики Беларусь он широко внедряется.

Исторически сложилось, что задачи рубок ухода сводятся к регулированию породного или качественного состава лесных насаждений, улучшению санитарного состояния насаждений, повышению качества древесины при главной рубке, увеличению размеров пользования древесиной с единицы площади; сокращению сроков выращивания технически спелой древесины путем создания условий для увеличения прироста перспективных деревьев, повышению устойчивости насаждений к неблагоприятным абиотическим и биотическим факторам, усилению водорегулирующих, почвозащитных, санитарно-гигиенических, рекреационно-оздоровительных, эстетических и других полезных функций леса [1].