

УДК 632.4:630*165.3

С. В. Пантелеев, мл. науч. сотрудник (ГНУ «Институт леса НАН Беларуси»);
О. Ю. Баранов, канд. биол. наук, вед. науч. сотрудник (ГНУ «Институт леса НАН Беларуси»);
А. В. Будько, магистр, вед. инженер-лесопатолог (Минское государственное
производственное лесохозяйственное объединение)

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ЯЗВЕННОГО И ОПУХОЛЕВОГО РАКА ЕЛИ ЕВРОПЕЙСКОЙ

В статье представлены результаты исследования авторов по идентификации видового состава патогенных грибов в пораженных раком тканях ели на основании использования методов ДНК-маркирования, описано проведение молекулярно-генетической диагностики видового состава микромицетов в исследованных образцах на основании секвенирования региона ITS1-5,8S rRNA-ITS2 рибосомальной ДНК грибов. Объектами исследования являлись образцы раковых повреждений ели. В исследованном материале выявлены два новых неизвестных вида грибов, которые ранее не были систематизированы и выделены в чистую культуру. Согласно данным международного банка генов NCBI, выявленные виды имеют близкое сходство по генетической структуре с аскомицетами. Нуклеотидные последовательности выявленных видов будут включены в молекулярно-генетическую базу данных патогенов лесных древесных видов Беларуси для разработки системы ранней диагностики и идентификации инфекционных болезней.

Spruce canker is one of the main infection disease of *Picea abies* (L.) Karst in Belarus. The aim of this study was to identify composition of pathogenic fungi species from spruce canker tissue by utilization of DNA assay. Object of research were samples of wood, which were collected from trees of Norway spruce with symptoms of canker. Molecular genetic identification of species composition of fungi in the investigated samples was carried out on base of sequencing of ITS1-5,8S rRNA-ITS2 region of ribosomal DNA of fungi. There were two new unknown species of fungi detected in the investigated material. To date these species have no official systematic description, and did not isolated in pure culture. According to international GenBank NCBI database, these species are closely related with Ascomycetes, by their DNA sequence. The results of work will be included in a molecular genetic database of forest pathogenes of Belarus for engineering of system of early diagnostics and identification.

Введение. Леса играют важную роль в жизни человека. Они имеют огромное народнохозяйственное значение, являясь естественно возобновляемым природным ресурсом древесного сырья и другой ценной недревесной продукции. Лесные насаждения выполняют почвозащитные, водорегулирующие, санитарно-гигиенические, рекреационные и другие полезные функции. Возрастающая их средообразующая и средозащитная роль, большой спрос на ценное древесное сырье и другие продукты леса выдвигают на первый план проблему сохранения, рационального многоцелевого использования и восстановления лесов.

Лесные насаждения в процессе своего роста и развития, особенно в условиях возрастающего антропогенного воздействия на окружающую среду, ухудшения общей экологической обстановки, периодически повторяющихся неблагоприятных климатических факторов, а также с наступлением естественной старости становятся менее устойчивыми и часто подвергаются воздействию многих вредных организмов, в том числе и возбудителей болезней древесных пород [1].

В последние десятилетия наблюдается явление массового усыхания ельников на территории

Республики Беларусь и увеличения площадей ослабленных и усыхающих еловых насаждений, что в свою очередь привело к интенсивному распространению различных болезней и, как следствие, потере биологической устойчивости насаждений, снижению полезных функций леса, широкому распространению патологических процессов в лесу. Вследствие этого отмечаются постоянные повреждения насаждений вредителями, развитие болезней, приводящих к ухудшению их санитарного состояния [2].

На санитарное состояние и продуктивность ели и насаждений с ее участием существенное влияние оказывают раковые заболевания. В еловых фитоценозах раковые заболевания встречаются повсеместно и приводят к массовому повреждению растущих деревьев.

Раковые болезни привлекли внимание лесоводов с давних пор, так как массовое их развитие наблюдалось и в прежние годы. Впервые рак на хвойных был отмечен Гартигом (Hartig, 1880) и Карстеном (Karsten, 1890) в конце XIX в. Позже появились работы американских и канадских ученых (Hansbroun, 1936; Locman, Cash, 1940; Wouse, 1962 и др.). В отечественной литературе первые упоминания о раковых заболеваниях встречаются в работах Щедровой В. И. (1965).

Позже появились работы Соколова Д. В., Дорожкина Н. А., Самцова А. С., Федорова В. Н., Слепьяна Э. И. и других ученых.

Интерес к изучению раковых болезней прежде всего обусловлен их высокой вредоносностью и широким ареалом распространения. Поражая деревья, они, как правило, представляют собой хронические заболевания с медленным и длительным течением патологического процесса, характеризующиеся образованием на стволах и ветвях раковых ран в виде углублений, часто окруженных наплывом или наростов в виде полушаровидной формы, расположенных преимущественно в нижней части стволов. Их развитие на одном дереве может продолжаться в течение длительного периода, иногда до нескольких десятков лет.

Раковые повреждения стволов древесных пород наносят большой ущерб лесному хозяйству, поскольку приводят к снижению продуктивности насаждений, ухудшению санитарного состояния лесов, снижению количества и качества заготавливаемых лесоматериалов и другим негативным последствиям [3].

Особенно сильно от раковых заболеваний страдает ель, так как из-за своей тонкой коры и поверхностной корневой системы она в высокой степени подвержена механическим повреждениям, а развитие раковых образований часто приурочено к этим местам. Кроме того, слабая смолопродуктивность не позволяет создать надежный барьер на пути проникновения инфекции патогена в поврежденную древесину. Патоген вначале заселяет поверхностную ткань ствола, затем проникает в более глубокие слои заболонной древесины. Распространяясь по сердцевинным лучам, он вызывает разрушение смоляных ходов, которое сопровождается смолотечением. Живица, вытекающая из разрушенных смоляных ходов, пропитывает прилегающие слои древесины и выделяется на поверхность поврежденного участка, затвердевая в виде отдельных капелек или сплошного слоя. Инфекция, проникнув в ствол, вызывает формирование долго не зарастающих, увеличивающихся со временем глубоких язв или наростов различной формы и размеров [4].

Возникновение, развитие и распространение раковых новообразований в еловых фитоценозах в значительной степени зависит от множества взаимосвязанных факторов, среди которых наиболее значимыми являются возраст насаждений, их состав, полнота, тип леса, интенсивность и технологии проводимых лесохозяйственных мероприятий, уровень рекреационной нагрузки, численность диких животных, обитающих в лесах, и неблагоприятные погодные условия. Однако самым главным фактором в возникновении

и развитии патологического процесса является вид патогенного организма [2].

По данным Н. А. Дорожкина, А. С. Самцова, В. Н. Федорова, Л. С. Осиповой, возбудителями язвенного рака являются грибы *Biatoridina pinastri*, *Ceratocystis piceae*, *Dasyscypha calyciformis*, *Nectria cucurbitula*, *Nectria fuckeliana*, *Sarea difformis*, так как эти виды наиболее часто обнаруживались в пораженной раком древесине.

Целью наших исследований являлась молекулярно-генетическая идентификация возбудителей язвенного и опухолевого рака ели европейской.

Выбор данного метода идентификации был связан с преимуществами ДНК-технологий, заключающихся в непосредственном анализе генетического материала патогена в пораженной ткани, минуя создание чистых культур. В данном случае количество выявляемой ДНК патогена соответствует титру инфекционного организма в ткани и не зависит от особенностей физиологического состояния и метаболизма паразита. В тоже время традиционные способы анализа, и в частности метод чистых культур, характеризуются данными типами недостатков. В основе культивирования большинства патогенных микроорганизмов лежит высокая степень приуроченности к определенному питательному субстрату, что в свою очередь требует проведения подбора питательных сред для выращивания. Следует также учесть и антогонистическое действие на культуры фитопатогенных организмов со стороны сапротрофов, находящихся на поверхности растений и имеющих больший потенциал развития на существующих вариантах питательных сред.

Основная часть. Сбор экспериментального материала проходил в очагах массового усыхания ели, расположенных на территории Двинской экспериментальной лесной базы Института леса Национальной академии наук Беларуси. Объектами исследования являлись образцы древесины ели европейской с внешними признаками поражения опухолевым и язвенным раком.

Отбор тканей для исследования проводился из слоев феллодермы, феллогена, флоэмы, камбия и заболонной древесины в стерильных условиях, что предотвращало попадание чужеродного генетического материала извне, включая сапрофитов, обитающих на поверхности перидермы.

На первом этапе исследования проводилось выделение суммарной ДНК из образцов древесины СТАВ-методом. Образцы древесины помещались в центрифужные пробирки типа «Eppendorf» (1,5 мл). Далее проводилась гомогенизация тканей прокаленными стеклянными пестиками в 400 мкл экстрагирующего буфера

СТАВ (1X). Для дальнейшей экстракции образцы помещались в водяную баню на 30 мин при 65°C [5, 6]. Затем гомогенат очищался от экстрактивных веществ, оставшихся после разрушения клеток, путем перемешивания на вортексе с хлороформом в соотношении 1 : 1. Далее образцы центрифугировались и в супернатант (250 мкл) добавлялось 62 мкл экстрагирующего буфера СТАВ (5X). Образцы помещались в водяную баню на 10 мин при 65°C. Затем процедура с хлороформом повторялась.

На следующем этапе проводилось осаждение ДНК в отобранном супернатанте изопропаноловым спиртом. Полученный после центрифугирования осадок ДНК дважды отмывался 70%-ным этанолом, подсушивался при 37°C и растворялся в 50 мкл дистиллированной воды [7].

В качестве диагностического маркера был выбран фрагмент оперона рибосомальной ДНК: ITS1-5,8SrRNA-ITS2, так как, с одной стороны, данный участок характеризуется высокой степенью консервативности генетической структуры внутри вида и в то же время специфичностью по отношению к другим видам. Кроме того, проведенные нами ранее исследования, а также анализ этого региона по данным международного банка генов NCBI показали, что размер данного региона является также видоспецифичным и постоянным и в свою очередь может являться первичным диагностическим признаком. Так, например, при анализе сообществ микромицетов количество зон амплификации будет соответствовать числу имеющихся в образце грибных видов [8].

Амплификация исследуемого региона рДНК грибов была выполнена на основании использовании ПЦР-технологии (полимеразной цепной реакции) [9]. В ходе анализа использовались следующий вариант ПЦР-смеси (в расчете на 1 образец): Hot Start Green PCR Master Mix (2X) (Fermentas, Литва) – 12,5 мкл, ITS1 (10 пмоль/мкл) – 1 мкл, ITS4 (10 пмоль/мкл) – 1 мкл [10]. Количество вносимого образца ДНК составляло 20–40 нг/мкл [5, 6]. Конечный объем смеси доводили деионизированной водой (MilliQ) до 25 мкл.

Амплификацию проводили с помощью термоциклера Tprofessional Base (Biometra, Германия) по следующей программе:

1 этап (1 цикл) – длительная денатурация: $t = 3$ мин, $T = 95^\circ\text{C}$;

2 этап (35 циклов): а) денатурация: $t = 30$ с, $T = 95^\circ\text{C}$; б) отжиг: $t = 30$ с, T_a (температура отжига) = $57,0^\circ\text{C}$; в) элонгация: $t = 45$ с, $T = 72^\circ\text{C}$;

3 этап – охлаждение реакционной смеси: $t = 4$ мин, $T = 4^\circ\text{C}$ [11].

Электрофоретическое фракционирование продуктов амплификации проводилось с ис-

пользованием 1×Трис-ЭДТА-боратной буферной системы [6] в 1%-ном агарозном геле.

В ходе проведения реакции амплификации образцов ДНК из древесины был получен ПЦР-спектр, представленный двумя вариантами ампликонов размерами 550 и 630 пар нуклеотидов. Наличие двух типов ампликонов свидетельствует о присутствии в исследуемых образцах ели двух видов грибов.

Анализ данных по генетической структуре исследованного региона рибосомальной ДНК в банке генов NCBI показал, что данные ампликоны не принадлежат ели, поскольку гомологичный регион ДНК *Picea abies* отличается по размеру от выявленных нами локусов грибной ДНК, он составляет более 1500 пар нуклеотидов и в ходе ПЦР-анализа не амплифицируется.

Фрагмент ПЦР-спектра исследованных образцов представлен на рис. 1.

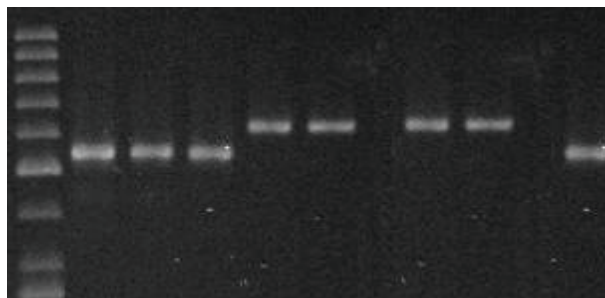


Рис. 1. Фрагмент ПЦР-спектра исследованных образцов при использовании праймеров ITS1 и ITS4

На основании интенсивности окраски этих фракций был сделан вывод о доминирующем присутствии двух видов микромицетов в исследованных образцах.

Повторное исследование образцов также не выявило наличия других вариантов ампликонов, что указывает на отсутствие в препаратах суммарной ДНК генетического материала других патогенов или его присутствие в следовых количествах.

Последующий анализ исследуемых фрагментов ДНК проводился методом секвенирования – расшифровкой нуклеотидных последовательностей. Данная технология является наиболее точным методом ДНК-анализа для проведения видовой идентификации [11].

На основании анализа полученных нуклеотидных последовательностей исследуемого региона рибосомальной ДНК в базе данных банка генов NCBI было установлено, что выделенные нами виды грибов – два ранее не описанных гриба, относящиеся к классу Аскомицеты. Факт того, что виды до сих пор не описаны и не выделены в чистые культуры, вероятно, связан с их паразитической специализацией.

Ниже приведены нуклеотидные последовательности видоспецифичного региона рибосомальной ДНК выявленных грибов (630 и 550 пар нуклеотидов) (рис. 2 и 3)

```

ATACGGTCAGACAAATTAACSTCCAAATCCCAAAGCGAAATG
TTTTAACTGCTACGCTCGGAACSTGGTGTCTGCGCCGGGCTA
CTTTTAAGGCACATTCACSTCCSTAAAAGAAATTAATGATG
CCCAATACCAAGSTAAGCTTGAGGGGTAGAAATGACGCTCG
AACAGGCATGCCCCCGGATACCGAGGGGCGCAATGTGCG
TTCAAAGATTTCGATGATTCACSTGAATTCGCAATTCACACT
ACTTATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAACC
AAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTAATATTTTTAACTTAAT
TTTCAGACATTTAGACASTAATACAGGCTTATTTAAAGAG
TTTTAATATATCCACGGCAGGCGAACCCACCGAGGTAACG
TTTTTAAAAGTTTCAAGGTTAGGCGGTGCTGGATTCCCT
TTTACAGGCCACATGAGGGAATAGTACACCCCATGGTTT

```

Рис. 2. Нуклеотидная структура ITS1-5.8SrRNA-ITS2 региона выявленного гриба (630 п. н.)

Следует отметить, что данный вид уже был идентифицирован методом ДНК-анализа в древесине латвийскими учеными Arhipova N., Gaitnieks T., Donis J., Stenlid J. и Vasaitis R. в комлевых гнилях ели в 2009 г. [12].

```

GAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCG
GAAGGATCATTACSTTTCAATGCAGCAGAAATGGGATGGTT
GAGTTTCTCGCCTCTCTGTCTGCCTGATTTCTACCTTGT
TTGTCSATATACTATTAATTCCTCGGCAGGCTTGTCTGCCGA
GTGAAACCAATATAACSTATTAAATTTCAATCAGCGTCT
GAACAAAATTAATAATTAACAACSTTTCAACAACGGATCTCT
GGTTCTGGCATCGATGAAGAACCGCAGCGAAATGCGATAAGT
AGTGTGAATTCGAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAA
CGCACATTCGCGCCCTTGGTATTCATGGGGCATGCCTGTT
CGAGCGTCAATTTGATCCTTCAAGCTTTGCTTGGTGTGGGT
GTTTGTCTGAGGGACTCGCCTTAAAGTAATTTGGCAGCCAG
TGTTTGGTTTTGAAGCCGAGCAACAAGTCGCG

```

Рис. 3. Нуклеотидная структура ITS1-5.8SrRNA-ITS2 региона выявленного гриба (550 п. н.)

Полученные данные депонированы в международный банк генов NCBI (National Center for Biotechnology Information).

Выявленным видам присвоены следующие идентификационные номера: неизвестный вид гриба с молекулярным весом 630 пар нуклеотидов – ID GU984801, неизвестный вид гриба с молекулярным весом 550 пар нуклеотидов – ID GU984802.

Заключение. Проведена видовая идентификация микрофлоры опухолоевого и язвенного рака на основании амплификации и секвенирования фрагмента рибосомального оперона ITS1-5,8SrRNA-ITS2. Полученные результаты указывает на присутствие в образцах пораженной ткани двух неизвестных видов грибов. Нуклеотидные последовательности выявленных видов будут включены в молекулярно-генетическую базу данных патогенов лесных

древесных видов Беларуси для разработки системы ранней диагностики и идентификации инфекционных болезней.

Литература

1. Лесная фитопатология: учеб. для студентов специальности «Лесное хозяйство» / Н. И. Федоров. – Минск: БГТУ, 2004. – 462 с.
2. Федоров, Н. И. Распространение язвенного рака в еловых лесах Беларуси / Н. И. Федоров, А. В. Бутько // Труды БГТУ. Сер. I, Лесное хозяйство. – 2008. – Вып. XVI. – С. 379–382.
3. Федоров, Н. И. Ассоциации микромицетов раковых образований стволов ели / Н. И. Федоров, А. В. Бутько, Д. Б. Беломесяцева // Сб. науч. тр. ИЛ НАН Беларуси. – 2008. – Вып. 68. – С. 576–583.
4. Федоров, Н. И. Фитопатологическое состояние еловых насаждений Негорельского учебно-опытного лесхоза / Н. И. Федоров, А. В. Бутько // Труды БГТУ. Сер. I, Лесное хозяйство. – 2007. – Вып. XV. – С. 395–398.
5. Молекулярно-генетические методы идентификации организмов / В. Е. Падутов [и др.]. // Проблемы лесоведения и лесоводства: сб. науч. тр. – 2005. – Вып. 64. – С. 189–196.
6. Падутов, В. Е. Методы молекулярно-генетического анализа / В. Е. Падутов, О. Ю. Баранов, Е. В. Воропаев. – Минск: Юнипол, 2007. – 176 с.
7. Rogers, S. O. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues / S. O. Rogers, A. J. Bendich // Plant Molecular Biology. – 1985. – V. 5. – P. 69–76.
8. Gargas, A. Polymerase chain reaction (PCR) primers for amplifying and sequencing 18S rDNA from lichenized fungi / A. Gargas, J. W. Taylor // Mycologia. – 1992. – V. 84. – P. 589–592.
9. Robert, S. S. Amplification of nucleic acid sequences: The choices multiply / S. S. Robert // J. NIH Res. 3(2), 1991. – P. 81–94.
10. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics / T. J. White [et al.] // PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, eds. / M. A. Innis [et al.]. – New York: Academic Press, Inc. – 1990. – P. 315–322.
11. Rauno, G. PCR: The first few cycles / G. Rauno [et al.] // Perkm-Elmer Cetus Amplifications 7, 1991. – P. 1–4.
12. Butt Rot Incidence and Related Losses in Latvian Picea abies (L.) Karst. / T. Gaitnieks [et al.] // Ziņojums IUFRO konferencē «12th International Meeting on Root and Butt Rots of Forest Trees». – California, 2007. – P. 12–19.

Поступила 14.04.2010