

УДК 632.4:630*165.3

О. Ю. Баранов, вед. науч. сотрудник (ГНУ «Институт леса НАН Беларуси»);
С. В. Пантелеев, мл. науч. сотрудник (ГНУ «Институт леса НАН Беларуси»);
Т. Ошако, Dr. hab., зав. отделом (Польский научно-исследовательский
институт лесного хозяйства)

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИДОВОГО СОСТАВА МИКРОМИЦЕТОВ С УСЫХАЮЩИХ ВЕТВЕЙ ЯСЕНЯ

Целью данной работы явилось изучение видового комплекса патогенных грибов с усыхающих ветвей ясеня на основании использования методов ДНК-маркирования. Для этого проводился ПЦР-анализ препаратов суммарной ДНК, полученных их пораженных образцов ветвей ясеня. Объектом для секвенирования явился регион рДНК, включающий фрагменты генов 18S и 28S рРНК, ген 5,8S рРНК, внутренние транскрибируемые спейсеры ITS1 и ITS2. Анализ результатов секвенирования в Генном Банке NCBI позволил идентифицировать генетический материал пяти выявленных видов грибов: *Aureobasidium pullulans*, *Ascomycete sp. DGC-2*, *ascomycetes Fungal sp. 104*, *Botryosphaeria stevensii*, *Chalara fraxinea*.

The aim of this study was to identify complex of pathogenic fungi species from shrunken ash branches by utilization of DNA assay. Fragments within the fungal ribosomal DNA operon was directly amplified from shrunken ash tissue, without preparation of fungal pure cultures. The amplified fragment included parts of the 18S and 28S rRNA genes, and whole the 5,8S rRNA gene and the internal transcribed spacers (ITS) 1 and 2. The PCR fragments were sequenced and analysed in NCBI GeneBank. Five species were identified: *Aureobasidium pullulans*, *Ascomycete sp. DGC-2*, *ascomycetes Fungal sp. 104*, *Botryosphaeria stevensii*, *Chalara fraxinea*.

Введение. Массовое усыхание ясеневых лесов впервые было отмечено в Австрии в 2005 г. [1]. В течение 2006–2007 гг. данное явление приобрело характер эпифитотии и получило распространение на территории Дании, Чехии, Финляндии, Венгрии, Германии, Литвы, Норвегии, Польши, Словении, Швеции [2–5]. За данный период количество усыхающих насаждений ясеня возросло многократно и достигло в ряде стран 60–80% от имеющихся в лесном фонде ясенников [6, 7].

Было установлено, что усыханию оказались подвержены все возрастные группы ясеня, однако в большей степени поражались молодые деревья и саженцы [3]. Также отмечалось, что симптоматика болезни была сходна в различных странах [8, 9] – это указывало на единую причину, вызвавшую усыхание.

Начальные симптомы представляли собой появление незначительных некротических пятен на стволе и ветвях в верхней части кроны дерева. В ходе развития заболевания данные поражения увеличивались в размере, распространяясь по растению, вызывая увядание, а затем и усыхание ветвей, вершины кроны, и зачастую вызывая гибель самого дерева [2, 3, 8, 10]. Также в большинстве случаев отмечалось скручивание и потемнение листьев, потемнение и отмирание почек; точечный и сплошной некроз коры, изменение окраски древесины с коричневатой до серой, распространяющейся вдоль древесных волокон. Кроме того, пораженные деревья часто образовывали придаточные ветви на пораженных стволах и побегах.

В общих чертах процесс усыхания был сходен с аналогичным, вызываемым ясеневой изумрудной узкотелой златкой (*Agrylus planipennis* Fairmaire), являющейся основным вредителем ясеневых лесов в Северной Америке и получившей в последнее время распространение на европейском континенте.

В 2006 г. была предложена наиболее вероятная причина, вызывающая массовое усыхание ясеня в Европе. По мнению большинства исследователей, основным фактором развития патологии является грибная инфекция, вызываемая гифомицетом *Chalara fraxinea* T. Kowalski sp. nov. В середине 2007 г. данный гриб был впервые выделен в чистую культуру из усыхающих молодых деревьев ясеня. Доказательством патогенности *C. fraxinea* явились результаты опытов по искусственному заражению деревьев ясеня грибными культурами [11].

Также было установлено, что *C. fraxinea* является анаморфой *Hymenoscyphus albidus* (Roberge) Phill. – сапрофитного аскомицета, естественного обитателя ясеневых лесов, широко распространенного на территории Европы [12].

Изучение особенностей биологии вида показало, что потенциальным источником патогенеза со стороны *C. fraxinea* могут являться воздух, почва, вода, зараженные растения и семена ясеня [2]. Тем не менее, до сих пор стратегия массового распространения инфекции остается не выясненной окончательно, поскольку наибольшим преимуществом для расселения характеризуются споры анемохорной телеоморфы *H. albidus*, а не липкие

конидии анаморфы *C. fraxinea* [12]. Потенциальная роль в распространении заболевания также может быть отведена насекомым, являющихся переносчиками различных видов *Chalara* [13, 14]. Однако до настоящего времени наличие процесса зоохории у *C. fraxinea* установлено не было.

Предполагаемую причину широкого расселения *C. fraxinea* связывают с изменениями условий окружающей среды и стратегии размножения патогена [12]. Тем не менее, отсутствие точных знаний об экологических особенностях *C. fraxinea* не позволяет разработать комплекс мероприятий для эффективного контроля уровня патогена.

Основным хозяином *C. fraxinea*, по имеющимся литературным сообщениям, принято считать только ясень обыкновенный. Однако имеются данные о возможности поражения *C. fraxinea* и ясеня узколистного *Fraxinus angustifolia* subsp. *danubialis* [15]. Восприимчивость других лесных пород к *C. fraxinea* остается невыясненной.

Несмотря на то что микромицет *C. fraxinea* был определен большинством исследователей как основной возбудитель инфекции ясеня, его окончательная роль в усыхании *Fraxinus excelsior* L. до конца остается невыясненной, поскольку пораженные деревья также характеризуются наличием и других потенциально патогенных грибов [12].

Таким образом, целью данной работы явилось изучение видового состава микромицетов с пораженных ветвей ясеня. В основу идентификации грибов был положен прямой анализ их генетического материала в инфицированных тканях растения. Использование методов ДНК-маркирования для фитопатологического анализа является более достоверным по сравнению с традиционным способом получения чистых культур из инфицированных образцов: получение культур изолятов осложнено попаданием большого количества сапрофитных (непатогенных) грибов и бактерий в среды во время переноса; создание чистых культур характеризуется значительной длительностью, трудоемкостью и отсутствием специфических сред для каждого конкретного вида; многие грибные организмы в культуре могут терять стадию полового процесса, что делает данные культуры непригодными для видовой идентификации.

Основная часть. Материал для анализа был предоставлен Польским научно-исследовательским институтом лесного хозяйства и представлял собой фрагменты ветвей ясеня обыкновенного, характеризующиеся признаками поражения, описанными выше.

Выделение ДНК производилось из некротизированных тканей коры, почек, древесины СТАВ-методом [16] без предварительного получения чистых культур патогенов из пораженных

ветвей. Для сравнительного анализа также были исследованы и образцы нормальных тканей.

ПЦР-анализ проводился с применением DreamTaq™ Green PCR Master Mix (Fermentas) согласно инструкции фирмы-производителя. В ходе исследования были использованы универсальные праймеры ITS1 и ITS4 [17], фланкирующих регион рДНК: ITS1 – 5,8S рРНК – ITS2. Электрофоретическое фракционирование ампликонов выполнялось в 1%-ном агарозном геле High Efficiency of Separation (Pharmacia Biotech) с целью эффективного их разделения и типирования. Для видовой идентификации грибов анализируемые ПЦР-зоны вырезали из геля и 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 GenBank NCBI [18].

Первичный анализ видового состава грибов основывался на анализе количества и размера выявляемых ампликонов изучаемого региона рДНК. Длина данного локуса рибосомальной ДНК является для вида величиной постоянной, что в определенной степени можно использовать в качестве первичного диагностического признака.

В ходе проведенного ДНК-анализа микрофлоры пораженных ветвей ясеня было выявлено пять различных вариантов ампликонов, что соответствует пяти различным видам грибов. В случаях тканей здоровых образцов генетического материала грибов выявлено не было.

Большинство проанализированных образцов пораженных тканей в ПЦР-спектре содержали одновременно генетический материал более чем одного вида микромицетов. Несмотря на многофракционный тип выявляемых спектров, наибольшей интенсивностью обычно характеризовался какой-либо один из типа ампликонов, что указывало на большее количественное содержание соответствующего ему вида гриба в исследуемом образце.

Ампликоны всех пяти выявленных видов грибов были использованы для секвенирования. Анализ данных нуклеотидных последовательностей в Генном Банке NCBI показал сходство изученных образцов со следующими видами (в скобках приводится соответствующий шифр образца в Генном Банке): *Aureobasidium pullulans* isolate I177 (GU062250.1), *Ascomycete* sp. DGC-2 (AY230245), аскомицет *Fungal* sp. 104 (FJ228206), *Botryosphaeria stevensii* (EU856766.1), *Chalara fraxinea* (FJ429386.1).

Aureobasidium pullulans [De Bary] – фитопатогенный вид (отдел Аскомикота, класс Догидеомии-

цеты), вызывающий стигматомироз хлопка. У человека и животных *A. pullulans* может быть причиной различных микозов, микотического кератита и перитонита. В лесозаготовительной и деревоперерабатывающей отрасли *A. pullulans* является одним из основных факторов, вызывающих порчи древесины сухостоя и изделий из дерева.

Ascomycete sp. DGC-2 – дрожжеподобный гриб (отдел Аскомицота, класс Дотидеомицеты), полученный в чистой культуре в 2003 г. из ризосферы сосны обыкновенной. Патогенность *Ascomycete sp.* DGC-2 к настоящему времени не изучена.

Fungal sp. 104 – дрожжеподобный гриб (отдел Аскомицота, класс Дотидеомицеты), выделенный из пораженных ветвей ясеня. Патогенность *Fungal sp.* 104 к настоящему времени не изучена. Впервые получен в чистой культуре в 2005 г.

Botryosphaeria stevensii (анаморфа *Diplodia mutila*) – дрожжеподобный патогенный гриб (отдел Аскомицота, класс Дотидеомицеты), являющийся основным возбудителем опухолевых заболеваний у ряда древесных (яблоня) и кустарниковых (виноград) сельскохозяйственных культур. По данным ряда исследователей, микромицет *B. stevensii* неоднократно встречался как составной компонент микрофлоры пораженных ветвей ясеня. Кроме того, представители рода *Botryosphaeria* являются возбудителем раковых опухолей дуба, осины, сосны, ели и др.

Chalara fraxinea – подробное описание данного вида представлено выше.

Заключение. В целом, результаты проведенного исследования показали, что микрофлора инфицированных ветвей ясеня характеризуется наличием комплекса патогенных видов, локализующихся дисперсно по пораженной области побега. Полученные данные поддерживают предположение о наличии сложного биологического комплекса усыхания ясеневых лесов, а не основополагающей роли *C. fraxinea* в деградации *F. excelsior*.

Литература

- Cech, T. L. Eschenschäden in Österreich / T. L. Cech // Forstschutz Aktuell. – 2006. – V. 37. – P. 18–20.
- European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO): официальный сайт [Электронный ресурс]. – 2009. – Режим доступа: www.eppo.org. – Дата доступа 15.12.2009.
- Halmschlager, E. First report of the ash dieback pathogen *Chalara fraxinea* on *Fraxinus excelsior* in Austria / E. Halmschlager, T. Kirisits // New Disease Reports. – 2008. – V. 17.
- Jankovsky, L. Alien Diseases of Woody Plants in the Czech Republic / L. Jankovsky, D. Palocikova, M. Dvorak // Forstschutz Aktuell. – 2008. – V. 44. – P. 32–34.
- Ogris, N. *Chalara fraxinea* causing common ash dieback newly reported in Slovenia / N. Ogris, T. Hauptman, D. Jurc // New Disease Reports. – 2009. – V. 19.
- Vasaitis, R. Emerging forest diseases in south-eastern Baltic Sea region / R. Vasaitis, V. Lygis // Network of Climate Change Risks on Forests (FoRisk): SNS Workshop, Umea, Sweden. – 2008. – P. 14–15.
- Lingren, D. Low budget breeding and seed production with special attention to a seed orchard proposal of ash (*Fraxinus*) / D. Lingren // Breeding and genetics of forest trees [Электронный ресурс]. – 2008. – Режим доступа: http://www-genfys.slu.se/staff/dagl/TREEBREED/EX/Ash_Seed_Production.htm.
- Kowalski, T. *Chalara fraxinea* sp. nov. associated with dieback of ash (*Fraxinus excelsior*) in Poland / T. Kowalski // Forest Pathology. – 2006. – V. 36. – P. 264–270.
- Thomsen, I. M. Attacks by honey fungus associated with crown dieback of ash / I. M. Thomsen, J. P. Skovsgaard // Skoven. – 2007. – V. 39. – P. 518–520.
- Ecology and growth of European ash (*Fraxinus excelsior* L.) / D. Dobrowolska [et al.] // ValBro. – 2008. – 35 p.
- Kowalski, T. Pathogenicity of *Chalara fraxinea* / T. Kowalski, O. Holdenrieder // Forest Pathology. – 2009. – V. 39. – P. 1–7.
- Kowalski, T. The teleomorph of *Chalara fraxinea*, the causal agent of ash dieback / T. Kowalski, O. Holdenrieder // Forest Pathology. – 2009. – V. 40. – P. 1–5.
- Nag Raj, T. R. The Anamorph as Generic Determinant in the Holomorph: The *Chalara* Connection in the Ascomycetes, with Special Reference to the Ophiostomatoid Fungi / T. R. Nag Raj, W. B. Kendrick // In *Ceratocystis and Ophiostoma: Taxonomy, Ecology, and Pathogenicity* / M. J. Wingfield [et al.]. – St. Paul: The American Phytopathological Society, 1993. – P. 61–70.
- Webber, J. Sapstain and Vascular Pathogens / J. Webber, C. Brasier // Risks of Exotic Forest Pests and their Impact on Trade: An International Online Workshop to reduce movement of forest pests with a minimal impact on trade. – 2001.
- Involvement of *Chalara fraxinea* in Ash Dieback in Austria / T. Kirisits [et al.] // Forstschutz Aktuell. – 2008. – V. 44. – P. 16–18.
- Падутов, В. Е. Методы молекулярно-генетического анализа / В. Е. Падутов, О. Ю. Баранов, Е. В. Воропаев. – Минск.: Юнипол, 2007. – 176 с.
- Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics / T. J. White [et al.] // PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications / Innis, M. [et al.]. – New York: Academic Press Inc., 1990. – P. 315–322.
- Генный банк NCBI: [Электронный ресурс]. – 2010. – Режим доступа: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank>.