

УДК 632.4:630*165.3

М. Я. Острикова, науч. сотрудник (ГНУ «Институт леса НАН Беларуси»);
О. Ю. Баранов, канд. биол. наук, вед. науч. сотрудник (ГНУ «Институт леса НАН Беларуси»);
С. В. Пантелеев, мл. науч. сотрудник (ГНУ «Институт леса НАН Беларуси»)

ОЦЕНКА ФИТОПАТОЛОГИЧЕСКОГО СОСТОЯНИЯ НАСАЖДЕНИЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ДНК-МАРКЕРОВ

В статье представлены результаты исследования авторов по выявлению и идентификации в почве различных насаждений патогенного базидиомицета *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref. на основании использования методов ДНК-маркирования, описано проведение молекулярно-генетической диагностики корневой губки на основании секвенирования региона ITS1-5.8S rRNA-ITS2 рибосомальной ДНК патогена. Объектами исследования являлись образцы почвы насаждений, пораженных корневой губкой и здоровых, и образцы почв, бывших в сельхозпользовании. Проведена оценка зараженности корневой губкой почв лесных насаждений с разной степенью расстроенности древостоев. Осуществлен анализ присутствия корневой губки в почвах, вышедших из сельхозпользования и часто использующихся для создания лесных культур.

The aim of this study was revealing and identification in soil of various plantings pathogenic fungi *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref. 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. Objects of research were samples of soil of the plantings amazed with a root sponge and healthy forest stands and samples of soils, were in agriculture. The estimation of contamination by a root sponge of soils of wood plantings with different degree forest stands is spent. The analysis of presence of a root sponge in the soils which have left agricultural using, wood cultures often used for creation is carried out.

Введение. В настоящее время в Республике Беларусь придается большое значение лесовосстановлению и лесоразведению. Так, например, за последние 8 лет (2001–2008 гг.) объем искусственного лесовосстановления и лесоразведения составил 323 253 га (в среднем в год – 40 406 га). Значительная часть лесных культур была создана на низкобальных землях бывшего сельскохозяйственного пользования (116 306 га.) [1]. Эти земли обладают низким плодородием, недостаточным увлажнением или наоборот, характеризуются переувлажненными участками, т. е. относятся к типам лесорастительных условий, соответствующих А₀, А₁, А₂ или А₄, А₅, реже В₁, В₂.

Особую угрозу для лесных культур, созданных на старопашотных землях, представляют фитопатогены, чаще всего грибы. К числу наиболее опасных возбудителей грибных болезней относится корневая губка (*Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref., синоним *Fomitopsis annosa* Karst.) – патогенный базидиомицет, вызывающий пеструю ситовую гниль корней хвойных пород. Данное заболевание вызывает загнивание одревесневших корней, ослабление и усыхание деревьев, приводит к гибели тысяч гектаров леса и обесцениванию древесины хвойных, что причиняет большой ущерб лесному хозяйству [2, 3].

Одним из основных источников заражения лесных культур корневой губкой является почва. Поэтому для повышения эффективности лесокультурных мероприятий необходимо ис-

пользовать методы выявления фитопатогенов в почве. Среди них традиционными являются метод чистых культур и биохимический.

Появление и развитие современных методов анализа генома и протеома позволило разработать новую область фитопатологии – молекулярную фитопатологию. Основными направлениями данной области являются: молекулярные механизмы взаимодействия «хозяин – паразит», генетико-биохимические основы патогенности, происхождение и эволюция генов вирулентности, разработка методов ранней диагностики и видовой идентификации патогенов [4].

Большое количество методов молекулярной фитопатологии основано на выявлении и анализе генетического материала (ДНК) патогена. Материалом для выделения ДНК могут являться любые части пораженного растения (как живые, так и мертвые), вода, почва и др. Количество материала, достаточное для анализа применительно к растительным тканям, может составлять несколько миллиграмм, в случае образцов воды и почвы – несколько грамм. Следует отметить, что современные методы ДНК-анализа способны обнаружить болезнетворный микроорганизм даже при условии, что в образце будет присутствовать только одна живая клетка патогена. ДНК-маркеры могут быть использованы как для непосредственной оценки зараженности самих растений, так и в ходе проведения профилактических мероприятий – анализа потенциальных источников инфекции, например почвы.

Исходя из всего вышесказанного, целью данной работы явилась разработка методов с использованием молекулярно-генетических маркеров для выявления и идентификации фитопатогена *H. annosum* в почвах различных насаждений.

Основная часть. Объектом исследований явились 33 почвенных образца, отобранных в здоровых и пораженных корневой губкой насаждениях Корневского лесничества Корневской ЭЛБ Института леса НАН Беларуси.

Три почвенных образца были отобраны в здоровом насаждении – квартал 173; выдел 17; состав 10С+Б; возраст 60 лет; Н = 20 м; Д = 24 см; тип МШ; бонитет I, полнота 0,7.

Три образца – в сосново-березовых культурах, с явными очагами усыхания – квартал 403; выдел 2; состав 5С+Б+Д; возраст 18 лет; Н = 8 м; Д = 8 см; тип МШ; бонитет I, полнота 1.

Восемь образцов почвы в сильно-пораженном насаждении – квартал 403; выдел 9; состав 7С+3Б; возраст 55 лет; Н = 18 м; Д = 16 см; тип МШ; бонитет I, полнота 0,6 и квартал 416; выдел 10; состав 7С3Б; возраст 60 лет; Н = 19 м; Д = 18 см; тип МШ.

Три почвенных образца были отобраны в культурах березы карельской – квартал 402; выдел 15 лет; состав 10Бкар; возраст 15 лет; Н = 7 м; Д = 8 см; тип МШ; бонитет II, полнота 0,6.

Шестнадцать образцов почвы взяли в 3-летних культурах сосны обыкновенной, созданных на почвах, бывших сельхозугодиями, – квартал 415; выдел 10; состав 7С3Б; возраст 3 года; Н = 0,8 м; тип МШ.

Выделение суммарной ДНК из почвы проводили следующим образом

Гомогенизация и экстракция. Навеску образца почвы массой 100 мг помещали в центрифужную пробирку типа «Eppendorf» объемом 1,5 мл, содержащую 1000 мкл экстрагирующего буфера следующего состава: 200 мМ раствор фосфата натрия; 1 мМ дитиотрейтол (ДТТ), 100 мМ раствор хлорида натрия; 50 мМ раствор трилона Б; 0,2%-ный раствор гексадецилтриметилбромид аммония (СТАВ); рН буфера доводили до значения 8,0. Далее производили гомогенизацию материала при комнатной температуре с помощью прокаленного стеклянного пестика и дальнейшим перемешиванием содержимого пробирок на вихревом смесителе (2400–2600 мин⁻¹) в течение 10 мин.

Очистка гомогенатов. После гомогенизации образцы центрифугировали при 15 000×g (Т = 25°C) в течение 30 мин. По окончании центрифугирования пипеткой отбирали 750 мкл супернатанта, переносили в другую центрифужную пробирку типа «Eppendorf» объемом 1,5 мл и смешивали с 750 мкл хлороформа. Далее производили перемешивание содержимого пробирок на вихревом смесителе (400–600 мин⁻¹) в течение 10 мин, центрифугировали при 15 000×g (Т = 25°C) в течение 20 мин.

Осаждение ДНК. По окончании центрифугирования пипеткой отбирали 700 мкл супернатанта, переносили в другую центрифужную пробирку типа «Eppendorf» объемом 1,5 мл и добавляли 750 мкл осаждающего буфера следующего состава: 20%-ный раствор полиэтиленгликоля (PEG) 6000 и 2,5 М раствор хлорида натрия. Содержимое пробирки перемешивали на вихревом смесителе (600 мин⁻¹) и инкубировали (Т = 35°C) в течение 30 мин. Далее производили центрифугирование при 15 000×g (Т = 25°C) в течение 30 мин. Супернатант сливали, а к полученному осадку ДНК добавляли 1000 мкл 65%-ного этанола, охлажденного до температуры 10°C, и перемешивали путем инвертирования пробирок. Затем содержимое пробирки центрифугировали при 15 000×g (Т = 4°C) в течение 10 мин. Процедуру промывки этанолом проводили 2–3 раза для удаления из осадка различных примесей ингибирующих ПЦР.

Очистка препаратов ДНК. Далее полученный осадок ДНК растворяли в 200 мкл дистиллированной воды, затем к раствору приливали 100 мкл 7,5 М ацетата аммония (рН 7,5). Пробирки инкубировали на ледяной бане (Т = 0°C) в течение 20 мин, после чего центрифугировали при 13 000×g (Т = 4°C) в течение 10 мин. Далее к отобранному супернатанту добавляли 300 мкл охлажденного изопропанола и оставляли на 20 мин, после чего центрифугировали при 13 000×g (Т = 4°C) в течение 10 мин. Полученный осадок ДНК промывали 1000 мкл 65%-ного раствора этанола аналогичным способом. После промывания содержимое пробирки центрифугировали при 15 000×g (Т = 4°C) в течение 10 мин. После промывки этанолом пробирки размещали в штативе горизонтально и, открыв крышки, просушивали осадок ДНК в течение 30–40 мин (Т = 45°C) до полного испарения этанола.

Растворение препаратов ДНК. Высушенный осадок растворяли в 100 мкл ТЕ-буфера (0,01 М раствор трис-НСl, 0,01 М раствор трилона Б, рН = 7,8) во встряхивающей ванне (200 мин⁻¹) при 40°C в течение 30 мин. Растворенную ДНК хранили при 4°C для последующего анализа.

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 [5]. Электрофоретическое фракционирование ампликонов выполнялось в 2%-ном агарозном геле High Efficiency of Separation (Pharmacia Biotech) с целью эффективного их разделения и типировки. Для идентификации корневой губки анализируемые ПЦР-зоны вырезали из геля и секвенировали с применением генетического анализатора ABI Prism 310 на основании использования набора BigDye Terminator Sequence Kit v.1.1 согласно рекомендациям ком-

пани-изготовителя. Видовая идентификация секвенированных ампликонов производилась с помощью программы BLAST в GenBank [6].

В ходе проведенного ДНК-анализа почвенных образцов из разных насаждений нам удалось выявить присутствие корневой губки. Типирование данного вида было основано на анализе размеров ампликонов ITS1-5.8SrRNA-ITS2 региона. Длина данного региона рибосомальной ДНК является для вида величиной постоянной, что в определенной степени можно использовать в качестве первичного диагностического признака. Нуклеотидная структура ITS1-5.8SrRNA-ITS2 региона возбудителя корневой губки (635 п. н.) изображена на рис. 1.

```

1  tccgtaggtgaacctgcggaaggatcattaacgaatatcg
41  tgcgggggttgaagctggcctctcggggcatgtgctcgccct
81  tgttcatatccatctcaacacctgtgcacactcgcggtgggt
121  cggctcgggctcttttttgcgcccttcgagccgctcttc
141  tcacaaactcttctgatgtcttcagaatggatcaatgct
181  ataaaaacgcacattatacaactttcaacaatggatctctc
221  ggctctcgcacatcgatgaagaacgcagcgaatgcgataag
261  taatgtgaattgcagaattcagtgaaatcatcgaatctttg
301  aacgcaccttgcgccctttggtattccgaagcagcgcct
341  gtttgagtgtcgtgaaattctcaacctgctctttcttg
381  tgaaagcgcgtgggcttggacttggaggcttctgctggtcc
421  tcgctgcatcgctctctcaaatgcattaggagaccctt
461  gtggtgcccgcctcctgtgataattgtctacgccgtggg
501  acaccgcgattgtggggacacctgcttccaaccgctgaaa
541  gacaacttcatcgaaacttgacctcaaatcggcgggact
581  acccgctgaacttaagcatatcaataagcggaggga

```

Рис. 1. Нуклеотидная структура ITS1-5.8SrRNA-ITS2 региона *H. annosum*

Во всех почвенных образцах, отобранных в здоровом насаждении, была обнаружена корневая губка. Данное насаждение находится вблизи от усыхающих сосново-березовых культур, поэтому там возможно распространение фитопатогена. Несмотря на присутствие корневой губки, видимых признаков заболевания у деревьев не выявлено.

Пример электрофоретического спектра ПЦР-продуктов почвенных образцов представлен на рис. 2.

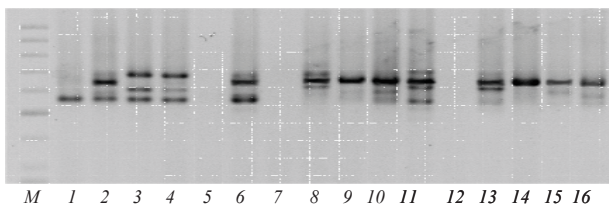


Рис. 2. Электрофоретический спектр ПЦР-продуктов образцов почвы:
M – маркер молекулярной массы;
1–16 – образцы почвы

В сосново-березовых культурах с очагами усыхания корневая губка была идентифицирована в двух образцах почвы из трех отобранных.

В сильно-пораженном насаждении данный фитопатоген был выявлен в семи почвенных образцах почвы, что составляет 87,5% от всей выборки.

Во всех изученных почвенных образцах березы карельской корневая губка не найдена. Следует отметить, что данные культуры были заложены на почвах сильно пораженного насаждения после санитарной рубки ухода. Исходя из этого, можно поддержать мнение А. П. Василюскаса [7] о том, что посадки березы могут служить весьма желательной, переходной культурой к соснякам, растительной ассоциацией для обеспечения необходимых почвенных условий для выращивания здоровых и высокополнотных насаждений сосны в будущем.

В ходе ДНК-анализа микрофлоры образцов, отобранных в почвах 3-летних культур сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.), ранее использовавшихся для сельскохозяйственных нужд, корневая губка была обнаружена в пяти из шестнадцати почвенных образцов, что составляет 31% от всей выборки.

Заключение. Исходя из полученных данных можно сделать заключение, что ДНК-маркеры могут быть использованы как для непосредственной оценки зараженности корневой губкой лесных насаждений с разной степенью расстроенности древостоев, так и для проведения профилактических мероприятий – анализа присутствия корневой губки в почвах, вышедших из сельхозпользования, часто используемых для создания лесных культур.

Литература

1. Обзор распространения вредителей болезней в лесах Республики Беларусь в 2008 году и прогноз их развития на 2009 год. – Минск: Министерство лесного хозяйства, 2009. – 130 с.
2. Федоров, Н. И. Лесная фитопатология / Н. И. Федоров. – Минск: БГТУ, 2004. – 462 с.
3. Негруцкий, С. Ф. Корневая губка / С. Ф. Негруцкий. – М.: Лесная промышленность, 1973. – 200 с.
4. Comprehensive and Molecular Phytopathology / Dyakov Yu. T. [et al.]. – Netherlands: Elsevier, 2007. – 483 p.
5. A Guide to Methods and Applications / T. J. White [et al.]. – New York, 1990. – P. 315–322.
6. National Center for Biotechnology Information [Электронный ресурс]. – Минск, 2010. – Режим доступа: www.ncbi.nlm.nih.gov. – Дата доступа: 15.12.2009.
7. Василюскас, А. П. Корневая губка и устойчивость экосистем хвойных лесов / А. П. Василюскас. – Вильнюс: Мокслас, 1989. – 175 с.

Поступила 14.04.2010