

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ДИАГНОСТИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК РАЗЛИЧНЫХ МАРКЕРНЫХ ЛОКУСОВ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ГРАФИОЗА

Иващенко Л.О.¹, Колганихина Г.Б.², Пантелеев С.В.³, Баранов О.Ю.³

¹Белорусский государственный технологический университет, г. Минск, Беларусь
e-mail: lyba281997@mail.ru;

²Институт лесоведения РАН (н.п. Успенское, Московская область, РФ)
e-mail: kolganihina@rambler.ru

³Институт леса НАН Беларуси, г. Гомель, Беларусь
e-mail: betula-belarus@mail.ru

Объектом молекулярно-генетических исследований являются возбудители графิโอза – *Ophiostomaspp.* В ходе исследования проведен сравнительный анализ четырех ДНК-маркеров на предмет эффективности их использования для диагностики и идентификации фитопатогенов. Установлено, что использование маркеров, локализованных в яДНК, позволяет диагностировать изоляты гибридной природы.

Графийоз – наиболее распространенная разновидность сосудистого микоза ильмовых пород, вызываемая грибами рода *Ophiostoma* [1]. Первоначально возникающие эпифитотии (первая половина XX в.) графийоза были ассоциированы с микромицетом *O. ulmi*, и затрагивали в основном североамериканские виды язвов [2]. В период 40–70 гг. прошлого века в центральных и западных регионах Европы отмечались незначительные случаи возникновения новых очагов графийоза, что, по всей видимости, было обусловлено распространением в популяциях *O. ulmi* вирусоподного элемента (Д-фактора), оказывающего негативное влияние на агрессивность и вирулентность фитопатогена [3]. Новый этап массового усыхания *Ulmus spp.* был зафиксирован с начала 70-х годов, и его характерной особенностью явилось равное повреждение как американских, так и европейских видов язвов. Проведенные микробиологические исследования показали, что возбудителем данного типа эпифитотий явился более агрессивный вид *O. novo-ulmi* [2]. Последующее изучение вида *O. novo-ulmi* выявило его неоднородность – подразделение на несколько подвидов, широкое распространение из которых получили *O. novo-ulmi ssp. novo-ulmi* и *O. novo-ulmi ssp. americana*. Следует отметить, что существующие внутривидовые различия *O. novo-ulmi* связаны не только с особенностями фенотипических признаков данных таксонов, но и приурочены к целому ряду их патогенетических свойств: так, например, *O. novo-ulmi ssp. americana* является более вирулентным, по сравнению с *O. novo-ulmi ssp. novo-ulmi* [3].

Несмотря на широкую изученность фитопатогенных грибов рода *Ophiostoma*, существующая систематика надвидовых и подвидовых таксонов в настоящее время подвергается ревизии, что связано как с наличием выраженных процессов интрогрессии и интерградации, так и действием в популяциях микроэволюционных факторов, приводящих к появлению новых форм и рас фитопатогенов.

Одним из подходов, используемых для решения вопросов систематики и уточнения таксономического статуса различных грибных организмов, является применение молекулярно-генетических маркеров. В то же время, эффективность выполнения тех или иных задач напрямую связана с информативностью использования ДНК-маркеров.

Целью данных исследований явилась сравнительная оценка маркерных локусов для проведения идентификации возбудителей графтиоза в образцах чистых культур и инфицированных тканях растений.

Маркеры на основе локусов рДНК. Первичная оценка маркеров на основе внутренних транскрибируемых спейсеров ITS1 и ITS2 рДНК (универсальные праймеры ITS1F и ITS4 [4]) проводилась при анализе чистых культур видов *O. ulmi* и *O. novo-ulmi* посредством секвенирования. Уровень внутривидовой изменчивости первичных последовательностей локусов для каждого из видов не превышал 1%, степень межвидовой дифференциации находилась в пределах 1–2%. Превалирующий характер межвидового и внутривидового полиморфизма был связан с нуклеотидными заменами, реже выявлялись инсерции и делеции. Среди видоспецифичных SNP *O. ulmi* по отношению к *O. novo-ulmi* являлись трансверсии C215T, C226T, T482C, T517C (референс *O. novo-ulmi*). Кроме того, в ряде моонуклеотидных мотивов (T)_n у *O. ulmi* диагностированы инсерции T в позициях 444 и 635. Проведение видовой диагностики в чистых культурах путем фрагментного анализа не представлялось возможным, что было обусловлено относительным сходством молекулярных размеров (~702 п.н.) амплифицированных продуктов. В то же время, дополнительное использование рестрикционного анализа ПЦР продуктов (применительно к отмеченным ранее видоспецифичным SNP), позволяло получать уникальные для видов электрофоретические спектры. Выполнение ПЦР-ПДРФ-диагностики в инфицированных тканях не представлялось возможным, что зачастую было связано с получением комплексных электрофоретических спектров за счет амплификации генетического материала сторонних грибов. Диагностика подвидов в пределах *O. novo-ulmi* также не представлялась возможной, что было связано с отсутствием выраженной таксоноспецифической изменчивости.

Маркеры на основе локусов мтДНК. Использование маркера Mt-rns (ген рРНК малой субъединицы митохондриальной рибосомы, праймеры MTSR1 и MTSR2 [5]) позволяло диагностировать *O. Ulmi* и *O. novo-ulmi* только в чистых культурах. В ходе ПЦР-анализа инфицированных растительных тканей, сходные по размеру амплифицированные продукты могли быть получены и для видов культивируемых и некультивируемых грибов. Кроме того, в случае деградированных тканей, амплификация фрагментов размером 1,3 тыс. п.н. (*O. novo-ulmi*) и 3,0 тыс. п.н. (*O. ulmi*), как правило, являлась затруднительной. ПЦР-диагностика подвидов в пределах *O. novo-ulmi* также не представлялась возможной, что было связано со сходным размером (1,3 тыс. п.н.) для подвидов *O. novo-ulmi ssp. americana* и *O. novo-ulmi ssp. novo-ulmi*.

Маркеры на основе локусов яДНК. В качестве диагностических маркеров использовались гены: детерминирующий форму колоний микромицета – *coll*; и *cu*, кодирующий специфический токсин полипептидной природы – цератоульмин [3, 6]. Используемые для амплификации праймеры COL1F и COL1R, CU1 и CU2 являлись видоспецифическими и позволяли амплифицировать локусы только *O. novo-ulmi*. При этом, на основании анализа полиморфных сайтов 250А/Т (*cu*) и 6G/А, 18 С/Т, 186 Т/С, 198 А/Г, 211 Т/С, 363 А/Г (*coll*) возможным явилось проведение диагностики подвидов *O. novo-ulmi ssp. americana* и *O. novo-ulmi ssp. novo-ulmi* как в чистых культурах, так и в условиях *in planta*. При этом, шесть видоспецифических SNP в гене *coll* наследовались вместе и в исследованных нами изолятах *O. novo-ulmi ssp. americana* или *O. novo-ulmi ssp. novo-ulmi* присутствовали одновременно. Также, следует отметить, что ряд изолятов на основе анализа маркера *cu* был диагностирован как *O. novo-ulmi ssp. americana*, а маркера *coll* – *O. novo-ulmi ssp. novo-ulmi*, и наоборот, что по всей видимости указывает на их гибридную природу *O. novo-ulmi ssp. novo-ulmi* × *americana*.

В целом, проведенное сравнение четырех маркеров показало, что наибольшей диагностической значимостью для диагностики графิโอза характеризуются маркеры *coll* и *cu*, позволяющие проводить анализ как чистых культур, так и инфицированных растений. Комплексное использование данных маркеров, также позволяет определять вероятностный гибридный статус изолятов.

Работа была частично поддержана грантами БРФФИ Б20Р-175 и РФФИ №20-54-00045.

ЛИТЕРАТУРА

1. Голландская болезнь ильмовых пород. // Энциклопедия лесного хозяйства: в 2 томах / глав. ред. С. А. Родин. – М.: ВНИИЛМ, 2006. – Т. 1. – С. 155–156.
2. Белякова Г. А., Дьяков Ю. Т., Тарасов К. Л. Ботаника: в 4 томах. – М.: изд. центр «Академия», 2006. Т. 1. Водоросли и грибы. С. 194–195.
3. Konrad H. et al. Genetic evidence for natural hybridization between the Dutch elm disease pathogens *Ophiostoma novo-ulmi ssp. novo-ulmi* and *O. novo-ulmi ssp. americana* // Plant Pathology. 2002. V. 51. №. 1. P. 78–84.
4. White T., Bruns T., Lee S., Taylor J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics // In: PCR protocols: a guide to methods and applications. 1990. P. 315-322.
5. Gibb E. A., Hausner G. Optional mitochondrial introns and evidence for a homing-endonuclease gene in the mtDNA *rnl* gene in *Ophiostoma ulmi* s. lat // Mycological research. 2005. V. 109. №. 10. P. 1112–1126.
6. Jürisoo L. et al. Health of elms and Dutch elm disease in Estonia // European Journal of Plant Pathology. 2019. V. 154. №. 3. P. 823–841.