

Л.О. Иващенко, асп., мл. науч. сотр.  
(БГТУ, г. Минск, Институт леса НАН Беларуси, г. Гомель);  
А.С. Рулева, студ. (БГТУ, г. Минск);  
О.Ю. Баранов, академик-секретарь, д-р биол. наук  
(Отделение биологических наук НАН Беларуси, г. Минск);  
М.О. Романенко, ст. науч. сотр., канд. с.-х. наук (БГТУ, г. Минск);  
А.А. Сазонов, начальник партии (РУП «Белгослес», г. Минск)

## **МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ ОФИОСТОМОВЫХ ГРИБОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ С ПРОЦЕССАМИ УСЫХАНИЯ ДУБА ЧЕРЕШЧАТОГО В БЕЛАРУСИ**

Усыхание дуба является глобальным явлением и одной из серьезных проблем в отношении сохранения лесных экосистем. Так, среди 450 видов рода *Quercus* в мире усыхание дуба отмечено для таких его представителей как *Q. rubra* L., *Q. velutina* Lam., *Q. coccinea* Muenchh. и *Q. alba* L. в США; *Q. robur*, *Q. rubra*, *Q. petraea* (Matt.) Liebl., *Q. ilex* и *Q. suber* в Европе [1].

Эти процессы связаны со стрессовыми условиями, возникающими, как правило, в результате воздействия абиотических и биотических факторов по отдельности или в комплексе.

Абиотические факторы, такие как уменьшение количества атмосферных осадков в вегетационный период, снижение уровня грунтовых вод, повышенные температуры воздуха, приводят к ослаблению деревьев, что влечет за собой проявление биотических факторов – распространения стволовых вредителей и фитопатогенных организмов, вызывающих повреждение сосудистой системы деревьев дуба.

Кроме прямого воздействия на деревья, стволовые вредители способствуют более быстрому распространению инфекций, перенося возбудителей заболеваний на поверхности или внутри тела насекомого [2].

В Беларуси наибольшее количество очагов болезней дуба фиксируется в южной части Беларуси, что связано, как с особенностью зонального распределения дубрав по территории республики, так и с ухудшением климатических и эдафогидрологических условий для его произрастания в данном регионе, вызвавших снижение устойчивости насаждений. Данная тенденция наблюдается по всей южной части ареала дуба черешчатого и обусловлена глобальным смещением границ его распространения в северном направлении [3].

Среди болезней дуба преобладают (более 99 %) инфекции, вызванные различными видами фитопатогенных грибов: стволовые гнили, некрозно-раковые болезни стволов и ветвей, сосудистые микозы, корневые гнили и мучнистая роса листьев [4].

Так, одним из основных типов заболеваний дуба является поражение сосудистой системы деревьев офиостомовыми грибами (семейство *Ophiostomataceae*).

Большинство представителей этого семейства могут заражать деревья через раны и трещины, возникающие в результате жизнедеятельности стволовых вредителей, а также механических повреждений, вызванных ветром, низкими отрицательными температурами и т. д. При этом, благоприятными условиями для проникновения и развития инфекции в дереве ствола являются глубокие повреждения покровных тканей и относительно недавний характер повреждения [5].

Наиболее современными и перспективными способами диагностики поражений сосудистой системы дуба являются методы ДНК-маркирования, что связано с их большей информативностью и диагностической точностью по сравнению с традиционными микробиологическими подходами [6].

Использование молекулярных технологий диагностики позволяет получить новые данные о биологии и патогенности возбудителей болезней, что имеет решающее значение для разработки более эффективных, доступных, устойчивых и надежных стратегий управления лесами, прогнозирования и минимизации патологических процессов.

Исходя из всего вышесказанного, целью данной работы явилась разработка праймеров для молекулярно-генетической идентификации офиостомовых грибов – патогенов сосудистой системы дуба черешчатого.

Экспериментальный материал был собран в июне–июле 2022 г. в лесных насаждениях Речицкого, Гомельского опытных лесхозов Гомельского ГПЛХО, Кобринского опытного лесхоза Бресткого ГПЛХО, Негорельского учебно-опытного лесхозов Минского ГПЛХО и был представлен образцами растительного материала с симптоматичных деревьев дуба черешчатого – керны, фрагменты небольших веток, заболонная часть древесины (количество образцов – 112 шт).

Образцы были собраны с деревьев дуба различного возраста (20–120 лет) с внешними признаками ослабления (стволовые гнили, усыхающие ветви, трещины и т. д.), а также с визуально здоровых деревьев.

На основании имеющихся в международном генном банке NCBI Blast (США) данных было сконструировано 9 родоспецифичных

праймеров (таблица), функциональность которых была проверена в этой же базе с использованием модуля Primer Blast.

**Таблица – Нуклеотидные последовательности разработанных праймеров**

Род	Праймер	Последовательность праймера (5'–3')
<i>Leptographium</i>	GLep (F)	CCCAACCCGTGCCAACTTA
	GLep (R)	AGATGCTTACTGCGCTCGG
	<i>Lepto</i> ITS3	TTTCAGGGGCTGCGCCG GCATCGATGAAGAACGCAGC
<i>Sporothrix</i>	GSp (F)	CCCTTGCGAACCATACCCAT
	GSp (R)	GGAGAACTTGCGTTCGGTACT
	Spo ITS4	CTCACGCGCCYCGTTGCG TCCTCCGCTTATTGATATGC
<i>Ophiostoma</i>	GOph (F)	CTGTTCTCGTTGCTTCTGGC
	GOph (R)	GCGAGAGAGAGAACTTGCCT
	Ophi ITS2	GGTCCCTTCGGGGCGC GCTGCGTTCTTCATCGATGC

Выделение ДНК осуществлялось с применением модифицированного СТАВ-метода из образцов пораженных растительных тканей. Полимеразную цепную реакцию проводили в соответствии с общепринятыми методиками. Первичная диагностика ДНК грибов проводилась на основании амплификации региона 18S рДНК-ВТС1-5,8S рДНК с использованием праймеров ITS1/ITS4. Последующая диагностика оphiостомовых грибов проводилась только в тех образцах, в которых достоверно было определено наличие фитопатогенных грибов с использованием разработанных пар праймеров для родов *Leptographium*, *Sporothrix*, *Ophiostoma*.

Результаты фрагментного анализа показали, что выявляемые микромицеты в образцах инфицированных растительных тканей являлись представителями родов *Ophiostoma* и *Sporothrix*. Как правило, присутствие грибов из этих родов было свойственно для образцов, собранных с деревьев, характеризующихся наличием поперечного рака, стволовых гнилей (развитие на стволе ложно-дубового и серно-желтого трутовиков), а также морозобойных трещин. При этом категория состояния большинства деревьев была определена как IIIa – ослабленное. Представителей рода *Leptographium* ни в одном из образцов выявлено не было.

Таким образом, функциональность и эффективность разработанных нами праймеров для молекулярно-генетической идентифика-

ции офиостомовых грибов, ассоциированных с увяданием сосудистой системы дуба черешчатого, доказываемая проведенными исследованиями *in silico* с применением модуля Primer BLAST в базе данных нуклеотидных последовательностей NCBI GenBank, а также *in vitro* с использованием в качестве контрольного образца вида *O. minus*, который не сработал с парами праймеров, разработанных для диагностики грибов из родов *Leptographium* и *Sporothrix*.

*Исследование выполнено при поддержке гранта Минобразования ГБ 22-035.*

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Choi W. I. et al. Oak decline syndrome in Korean forests: History, biology, and prospects for Korean oak wilt // *Forests*. – 2022. – Vol. 13 (6). – P. 964–976.
2. Machacova M. et al. Oak Decline Caused by Biotic and Abiotic Factors in Central Europe: A Case Study from the Czech Republic // *Forests*, 2022. – Vol. 13 (8). – P. 1223.
3. Баранов О.Ю. Сравнительная оценка структуры микобиомов фитофагов дуба черешчатого на основе данных фрагментного анализа локуса ITS1 / О.Ю. Баранов, Л.О. Иващенко, С.В. Пантелеев, Г.Б. Колганихина, А.А. Сазонов // *Проблемы лесоведения и лесоводства: сборник научных трудов ИНСТИТУТ ЛЕСА НАН Беларуси*. – Гомель, 2021. – №81. – С.126–134.
4. Обзор лесопатологического и санитарного состояния лесного фонда Республики Беларусь за 2021 год и прогноз развития патологических процессов в 2022 году / Министерство лесного хозяйства Республики Беларусь, Государственное учреждение по защите и мониторингу леса «Беллесозащита». – аг. Ждановичи, 2022. – 84 с.
5. Баранов О.Ю., Иващенко Л.О. Разработка набора праймеров для диагностики офиостомовых грибов, ассоциированных с процессами усахания дуба черешчатого // *Труды БГТУ. Сер. 1, Лесное хозяйство, природопользование и перераб. возобновляемых ресурсов*. 2023.
6. Падутов В.Е., Баранов О.Ю., Воропаев Е.В. Методы молекулярно-генетического анализа. – Минск: Юнипол, 2007. – 176 с.