

**ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДОВ
МОЛЕКУЛЯРНОЙ ГЕНЕТИКИ ДЛЯ РЕШЕНИЯ
ФУНДАМЕНТАЛЬНЫХ И ПРИКЛАДНЫХ ЗАДАЧ
ЛЕСНОЙ ЭНТОМОЛОГИИ И ФИТОПАТОЛОГИИ**

УДК 632.4: 630*165.3

**ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДОВ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ГЕНЕТИКИ
ДЛЯ АНАЛИЗА НАЛИЧИЯ ФИТОПАТОГЕНОВ В ЛЕСНЫХ
НАСАЖДЕНИЯХ И ПИТОМНИКАХ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

© 2014 г. Т. С. Алимова¹, В. А. Сиволапов², Н. А. Карпеченко²,
О. К. Шишкина¹, С. В. Пантелеев³, О. А. Ковалевич³

¹ Российский центр защиты леса

141200, Московская обл., Пушкино, ул. Надсоновская, 13

² Филиал Российского центра защиты леса

Центр защиты леса Воронежской области

394000, Воронеж, ул. Ломоносова, 105

³ Институт леса Национальной академии наук Беларуси

Республика Беларусь, 246001, Гомель, ул. Пролетарская, 71

E-mail: shok3011@yandex.ru, vladimir-sivolapov@yandex.ru,

pukidesu@gmail.com, stasikdesu@mail.ru

Поступила в редакцию 31.07.2014 г.

Приведены результаты применения методов молекулярной генетики для анализа наличия фитопатогенов в лесных насаждениях и питомниках Российской Федерации, в том числе Ризины волнистой (*Rhizina undulata* Fr. 1815) и корневой губки (*Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref 1889). Обсуждаются перспективы и преимущества использования ДНК-анализа для ранней диагностики заболеваний растений без выделения патогена в чистую культуру, сокращения сроков исследования, возможности проведения массовых обследований и др.

Ключевые слова: фитопатогены, анализ ДНК фитопатогенов, Ризина волнистая (*Rhizina undulata* Fr. 1815), корневая губка (*Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref 1889), фузариозы, фомозы, лесные насаждения, лесные питомники, Российская Федерация.

ВВЕДЕНИЕ

Применение анализа ДНК патогенов для фитопатологического мониторинга лесов чрезвычайно важно. Наличие или отсутствие патогена растений (грибы, бактерии, вирусы) в настоящее время может быть определено по анализу его ДНК без выделения в чистую культуру. Применение метода анализа ДНК патогена позволяет сократить сроки исследования с нескольких недель до 2–3 дней и избежать трудностей, связанных с выделением и выращиванием микроорганизмов, являющихся облигатными паразитами. Для анализа ДНК в этом случае применяют ви-

доспецифические праймеры, которые сразу дают ответ: присутствует или отсутствует ДНК патогена в образце. Инфицирование может быть определено на самой ранней стадии, когда внешне оно еще никак не проявляется. Это дает возможность применять меры борьбы с инфекциями в ранние сроки, когда они наиболее эффективны. В силу скорости и высокой производительности метод анализа ДНК патогенов дает возможность массового обследования здоровых насаждений с целью оценки перспективы их развития.

Перспективы развития данного направления работы очень широки. С помощью анализа ДНК патогенов можно:

– проводить фитопатологический анализ насаждений на ранних стадиях развития инфекции без выделения патогена в чистую культуру;

– определять наличие фитопатогенов в почве при подготовке посадочных площадей (использовать в качестве экспресс-анализа) без выделения патогена в чистую культуру;

– определять истинные границы распространения инфекции при обнаружении очага поражения;

– определять источник инфекции (вода, почва и др.) и количество патогенов (максимально допустимую концентрацию для заражения растений);

– давать оценку эффективности карантинных и санитарных мероприятий;

– определять породный состав на зараженных территориях;

– выявлять устойчивые и толерантные клоны древесных пород;

– осуществлять мониторинг появления новых видов патогенов и гибридов (Баранов и др., 2010, 2012, 2013).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В питомниках для генетического анализа отбирали 20–30 пораженных растений в каждой возрастной группе, в насаждениях – части пораженных растений на границе здоровой и больной ткани, а также почву – слой 1–10 см от поверхности, стерильно, 13 проб на гектар, «конвертом». Хранили образцы при температуре –20 °С или в воздушно-сухом состоянии.

За основу взяты методы анализа ДНК, описанные или разработанные в Институте леса НАН Беларуси (Падутов и др., 2007), которые в процессе обработки были частич-

но модифицированы. Выделение ДНК проводили модифицированным СТАВ-методом. Для диагностики фитопатогенов использовали два типа праймеров: универсальные и видоспецифические (табл. 1).

В сомнительных случаях применялись и видоспецифические праймеры.

Для постановки ПЦР использовали следующую реакционную смесь (на 1 образец, конечный объем 25 мкл): 10 х ПЦР буфер (100мМ *tris*-HCl, pH 9.2, 250 мМ KCl) – 2.5 мкл, 25 мМ MgCl₂ – 2.5 мкл, вода (ПЦР-реагент) – 16 мкл, смесь 5 мМ нуклеотидтрифосфатов – 1 мкл, 10 мМ раствор каждого праймера – 1 мкл, образец ДНК (40 нг/мкл) – 1 мкл, Taq ДНК-полимераза (1 ед./мкл) – 1 мкл или (с использованием смеси 2-blue): смесь 2-blue – 10 мкл, вода деионизированная – 10 мкл, смесь 5 мМ нуклеотидтрифосфатов – 1 мкл, 10 мМ раствор каждого праймера – 1 мкл, образец ДНК (40 нг/мкл) – 1 мкл, Taq ДНК-полимераза (1 ед./мкл) – 1 мкл.

Режим амплификации:

1-й этап (1 цикл). Денатурация. $t = 15$ мин, $T = 95$ °С.

2-й этап (37 циклов). Денатурация. $t = 15$ с, $T = 95$ °С. Отжиг. $t = 20$ с, $T = 55$ – 65 °С. Элонгация. $t = 40$ с, $T = 72$ °С.

3-й этап (1 цикл). Элонгация. $t = 4$ мин, $T = 72$ °С.

4-й этап (1 цикл). Охлаждение реакционной смеси. $t = 5$ мин, $T = 4$ °С.

Ампликоны разделяли с помощью электрофореза в 2%-м агарозном геле, визуализацию продуктов производили путем окрашивания в растворе бромистого этидия. Наличие патогена определяли по электрофоретической подвижности. В качестве контроля использовали плодовые тела патогенов или явно поврежденные ткани. При необходимости производили секвенирование по Сенгеру на генетическом анализаторе марки ABI Prism 310 и определение до вида с использованием программы BLAST.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Перспективы применения молекулярно-генетических методов в лесной фитопатологии очень широки, поскольку они очень вы-

Таблица 1. Универсальные праймеры для определения рибосомальной ДНК грибов-патогенов

Локус	Праймер, последовательность нуклеотидов
ITS (рДНК)	ITS1 tcc-gta-ggt-gaa-cct-gcg-g
	ITS2 gct-gcg-ttc-ttc-ata-gat-gc
	ITS3 gca-tcg-atg-aag-aac-gca-gc,
	ITS4 tcc-tcc-gct-tat-tga-tat-gc,
	ITS1 tcc-gta-ggt-gaa-cct-gcg-g
	ITS4 tcc-tcc-gct-tat-tga-tat-gc

Таблица 2. Сравнительный анализ методов диагностики болезней посадочного материала

Критерий	Метод диагностики					Молекулярно-генетический (ПЦР-РВ)
	Морфологический (визуальный)	Микробиологический	Иммуноферментный	Биохимический	Молекулярно-генетический (ПЦР-РВ)	
Диагностируемая стадия патогенеза	Поздняя	Средняя	Ранняя	Средняя	Средняя	Ранняя
Срок выполнения анализа	5–10 мин	10–15 сут	2–3 ч	5–10 мин	5–10 мин	2–5 ч
Себестоимость проведения анализа одного образца	–	25–30 у. е.	1–5 у. е.	10–15 у. е.	10–15 у. е.	8–25 у. е.
Точность определения болезни	Низкая	Высокая	Средняя	Средняя	Средняя	Высокая
Наличие специализированного оборудования	Не требуется	Необходимо	Необходимо	Не требуется	Не требуется	Необходимо
Таксономический ранг определения инфекции	Нет	Род, вид	Род	Семейство, род	Семейство, род	Вид, штамм
Количество диагностируемых заболеваний (разработанных методик)	15–20	Не ограничен	30–40	10–15	10–15	Не ограничен
Используемые диагностические критерии	Симптомы поражения растений	Морфологические и физиологические признаки патогена	Антигены патогена	Вторичные метаболиты патогена	Вторичные метаболиты патогена	Генетический материал патогена
Возможность автоматизации анализа	Нет	Нет	Есть	Нет	Нет	Есть
Общая эффективность диагностики	Низкая	Средняя	Высокая	Средняя	Средняя	Высокая

сокопроизводительны, точны и не требуют особых условий для хранения и транспортировки образцов. В Институте леса НАН Беларуси проводится сравнительный анализ различных методов определения фитопатогенов (табл. 2) (Баранов и др., 2013), из которого видно, что молекулярно-генетический метод является наиболее быстрым и точным как для качественного, так и для количественного определения наличия патогена.

За период 2010–2014 гг. в Московской области обследовано 1700 га площадей, подготовленных для посадки, на наличие генетического материала корневой губки (табл. 3).

Кроме того, обследовано 674 га территорий в Московской области, пройденных пожарами в 2010 г., с целью отбора проб почвы для определения наличия генетического материала Ризины волнистой (*Rhizina undulata* Fr.). Одновременно эти образцы протестированы на наличие генетического материала корневой губки.

Р. волнистая вызывает гибель саженцев в течение первых трех лет после посадки, если лесовосстановление проведено в первый год после пожара.

Результаты обследования территорий, пройденных пожарами в 2010 г., на наличие

Таблица 3. Результаты анализа образцов почвы площадей, подготовленных под посадки 2012–2014 гг., на наличие генетического материала корневой губки (*H. annozum* (Fr.) Breff 1889)

№ п/п	Место отбора проб	Частота встречаемости генетического материала корневой губки, %
1	Московское учебно-опытное лесничество учебно-опытное участковое лесничество (бывшее Пушкинское), кв. 143, л/к ели, пл. 16 га, посадка в 2013 г.	25.0
2	Московское учебно-опытное лесничество, Фряновское участковое лесничество, кв. 34, вырубка, пл. 13,2 га	4.5
3	Московское учебно-опытное лесничество, Красноармейское участковое лесничество, кв. 13, л/к ели – 16 га, л/к сосны – 6,4 га, вырубка с нарезанными бороздами, пл. 12 га	2.5
4	Московское учебно-опытное лесничество, Фряновское участковое лесничество, кв. 31, смешанные культуры дуб и ель, пл. 18 га, посадка 8 мая 2012 г.	5.8
5	Ногинское лесничество, Электрогорское участковое лесничество, кв. 29, 47, 51, 52, 55 – пл. 209,6 га	32.0
6	Орехово-Зуевское лесничество, Ильинское участковое лесничество, кв. 7, пл. 49,5 га	85.5
7	Орехово-Зуевское лесничество, Зуевское участковое лесничество, кв. 23–28, пл. 199,7 га	61.7
8	Ногинское лесничество, Большедворское участковое лесничество, кв. 26, 33, пл. 46,4 га	52.9
9	Орехово-Зуевское лесничество, Зуевское участковое лесничество, кв. 91, пл. 50 га	50.9
10	Орехово-Зуевское лесничество, Губинское участковое лесничество, кв. 34, 35, пл. 106,2 га	19.3
11	Орехово-Зуевское лесничество, Городищенское участковое лесничество, кв. 68, 69, 83–85, пл. 62,5 га	20.5
12	Луховицкое лесничество, Чернореченское участковое лесничество, кв. 50, пл. 98 га	28.1
13	Луховицкое лесничество, Белоомутское участковое лесничество, кв. 19, пл. 100,1 га	46.3
14	Луховицкое лесничество, Чернореченское участковое лесничество, кв. 50, пл. 98 га	28.1

генетического материала *P. волнистой* и корневой губки:

– Ногинское лесничество, Электрогорское участковое лесничество Московской области, кв. 56–58, общая площадь 230.5 га. Частота встречаемости *P. волнистой* 53.5 %, корневой губки – 28.5 %.

– Орехово-Зуевское лесничество, Зуевское участковое лесничество Московской области, кв. 23–26, общая площадь 219.7 га. Частота встречаемости *P. волнистой* 36.0 %, корневой губки – 8.0 %.

– Орехово-Зуевское лесничество, Куровское участковое лесничество Московской области, кв. 31, 32, общая площадь 34.0 га. Частота встречаемости *P. волнистой* 22.0 %, корневой губки – 21.0 %.

– Орехово-Зуевское лесничество, Абрамовское участковое лесничество Московской области, кв. 4, общая площадь 36.0 га. Частота встречаемости *P. волнистой* 36.0 %, корневой губки – 8.0 %.

– Орехово-Зуевское лесничество, Куровское участковое лесничество Московской области, кв. 4, общая площадь 72.2 га. Частота встречаемости *P. волнистой* 62.0 %, корневой губки – 59.0 %.

– Виноградовское лесничество, Раменское участковое лесничество Московской области, кв. 51, 58 общая площадь 82 га. Частота встречаемости *P. волнистой* 86.0 %, корневой губки – 19.0 %.

Способность *P. волнистой* паразитировать на корнях хвойных стала известна в Европе еще в конце прошлого века, но до сих пор полностью не исследована. Гриб может поражать саженцы и деревья в возрасте 20–50 лет многих видов хвойных, например сосны, лиственницы. Ризина развивается как паразит на корнях преимущественно после разжигания костров или сжигания древесных остатков, на местах лесных пожаров, поскольку прогревание почвы под действием огня стимулирует развитие этого гриба. Аскоспоры паразита выбрасываются из апотециев в июле–сентябре и вымываются дождем в почву. При лесных пожарах и у костров многие из них погибают. Однако в зоне с температурой 38–45 °С аскоспоры подвер-

гаются тепловому шоку и активно прорастают. Развивающийся мицелий заселяет корни живых деревьев до развития конкурентной микрофлоры. Здесь играет роль и частичная стерилизация почвы огнем. В дальнейшем инфекция может передаваться от дерева к дереву, вызывая их заболевание и гибель. В хвойных лесах развитие болезни наблюдается преимущественно вокруг старых костров. Сильно поражаются саженцы (их гибель иногда доходит до 100 %). Характерная черта этой болезни – стремительное развитие. Она внезапно появляется, в течение нескольких лет (обычно 5–6) нарастает, вызывая массовое усыхание деревьев, а потом медленно утихает (Сидорова и др., 1976).

После лесных пожаров *P. волнистая* развивается в больших количествах, особенно на песчаной почве и хорошо освещенных местах.

Гибель саженцев при восстановлении леса в первый год после пожаров – явление широко известное. Для определения роли *P. волнистой* в данном процессе мы заложили пробные площади на участках, восстановленных осенью 2011 г., в первый год после пожара, возле с. Бояркино Раменского р-на Московской обл. Провели весенние и осенние обследования пробных площадей на наличие в корнях погибших растений и почве вокруг них генетического материала *P. волнистой*. В мае 2012 г. гибель сеянцев сосны составила 10 %, генетический материал *P. волнистой* обнаружен в 50 % случаев, в сентябре 2012 г. гибель сеянцев сосны (общая) составила 25 %, генетический материал *P. волнистой* обнаружен в 95 % случаев, в 2013 г. (весной) гибель сеянцев составила 40 %, генетический материал *P. волнистой* на корнях – 95 % случаев, осенью – гибель 50 %, *P. волнистая* – 100 %. Однако на второй год обследования осенью генетический материал *P. волнистой* в почве уже не определялся и обнаружен только на корнях погибших растений.

Таким образом, можно сделать вывод, что восстановление лесов в первый год после пожаров нецелесообразно, половина сеянцев погибает в результате поражения *P. волнистой*, причем процесс гибели продолжается в течение нескольких лет.

Проведено определение степени зараженности 20-летних культур ели корневой губкой (Московская обл., Дмитровское лесничество, Пантюхинское участковое, 45.8 га). Ее генетического материала не обнаружено. Исследовано 284 образца, сделано 1128 анализов.

В рамках выполнения работ по Комплексной программе «БИО-2020» в ФБУ «Рослесозащита» нами составлен план фитосанитарного обследования питомников по всей территории РФ до 2020 г. К настоящему времени проведен мониторинг на 175 га лесных питомников Московской и Липецкой областей. Показано, что наиболее часто гибель сеянцев происходит в результате поражения различными видами патогенного гриба *Phoma* sp. (фомозы), а не видами рода *Fusarium* sp. (фузариозы), шютте и др., как считалось ранее.

Так, в результате фитосанитарного обследования Яманского лесного питомника Грязинского лесничества Липецкой области и генетического анализа сиквенса ПЦР-продукта получена следующая нуклеотидная последовательность:

«ctacctgatccgaggctcagagtgtaaaaagctacttttggacgtcgtcgttatgagtgcaaagcgcgagatgtactgcgctccgaaatcaatacgcggtgccaattgtttgaggcgagtctacgcgagaggcgagacaaacaccaacaccaagcagagcttg aaggtacaatgacgctcgaacaggcattgccccatggaatac caagggcgcaatgtgcgttcaagattcgatgattcactgaa ttctgcaattcactacttatcgatttgcgttcttcacg atgccagaaccaagagatccgttgtgaaagttgtaactatta agtttttcagacgctgattgcaactgcaaat», которая идентифицирована с помощью программы BLAST в GenBank NCBI как *Phoma pomorum*.

Из полученной партии инфицированных сеянцев 75 %, здоровых – 25 %.

В лесных питомниках патоген *Phoma pomorum* вызывает заболевание фомоз (сухую гниль) посадочного материала хвойных пород. Заражение растений данным патогеном происходит в основном в период переувлажнения почвы через хвою, контактирующую с землей. Затем патоген распространяется вдоль по стеблю и вызывает гибель верхушечной почки растения. На начальном этапе развития болезни поражаются преимущественно ослабленные сеянцы и са-

женцы, а в случае массовой вспышки патогена – и здоровый посадочный материал.

Внешнее проявление болезней, вызываемых данным грибом, сводится к пожелтению и усыханию хвои (шютте), что зачастую при непосредственной визуальной оценке приводит к ошибочной постановке диагноза обыкновенное шютте сосны (вызывается грибом *Lophodermium pinastri*) или ели (вызывается грибом *Lirula macrospora*).

Аналогичные данные получены несколько ранее и белорусскими коллегами (Баранов и др., 2013).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Применение методов молекулярно-генетического анализа позволяет быстро и точно проводить диагностику заболеваний растений в лесных насаждениях и питомниках. Внедрение этих методов в практику лесного хозяйства России позволит сохранять леса, успешно применяя меры борьбы с болезнями на самых ранних стадиях развития инфекции, когда эти меры наиболее эффективны. Производительность и относительно невысокая стоимость анализов позволяют проводить массовые обследования, ранняя диагностика – делать прогноз развития насаждений по степени их зараженности, а также определять истинные границы очага поражения и источник заражения. Обследования, проведенные в Московской и Липецкой областях, это подтверждают.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Баранов О. Ю., Падутов В. Е., Пантелеев С. В. Молекулярно-генетическое маркирование патогенеза лесных древесных видов // Вес. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. биял. наук. Прилож. к журналу «Молодежь в науке – 2009». 2010. № 4. С. 10–12.
- Баранов О. Ю., Ярмолович В. А., Пантелеев С. В., Купреенко Д. Г. Молекулярно-генетическая диагностика грибных болезней в лесных питомниках // Лесн. и охот. хозяйство. 2012. № 6. <http://scholar.google.com/>
- Баранов О. Ю., Ярмолович В. А., Пантелеев С. В. Молекулярно-генетические осо-

- бенности пораженных шютте тканей хвои сеянцев ели европейской // Современное состояние и перспективы охраны и защиты лесов в системе устойчивого развития: мат-лы Междунар. науч. конф. // Институт леса НАН Беларуси. 2013. С. 63–66.
- Падутов В. Е., Баранов О. Ю., Воронаев Е. В. Методы молекулярно-генетического анализа. Минск: Юнипол, 2007. 176 с.
- Сидорова И. И. Класс Аскомицеты (Ascomycetes) // Жизнь растений. В шести т. / Под ред. чл.-кор. АН СССР, проф. А. А. Федорова. Т. 2 под ред. проф. М. В. Горленко. М.: Просвещение, 1976. 479 с.
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>
<http://www.forestpests.org/nursery/phomabligh.html>

Molecular Genetic Methods Implementation for Phytopathogen Identification in Forest Stands and Nurseries of the Russian Federation

T. S. Alimova¹, V. A. Sivolapov², N. A. Karpechenko²,
O. K. Shishkina¹, S. V. Panteleev³, O. A. Kovalevich³

¹ Russian Centre for Forest Protection

Nadsonovskaya str., 13, Pushkino, Moscow Region, 141200 Russian Federation

² Branch of the Russian Centre for Forest Protection
Centre for Forest Protection of Voronezh Region

Lomonosov str., 105, Voronezh, 394000 Russian Federation

³ Institute of Forest, National Academy of Sciences of Belarus
Proletarskaya str., 71, Gomel, 246001 Republic of Belarus

E-mail: shok3011@yandex.ru, vladimir-sivolapov@yandex.ru,
pukidesu@gmail.com, stasikdesu@mail.ru

The results of the application of molecular genetics methods for the analysis of the plant pathogens present in forest plantations and nurseries of the Russian Federation, including doughnut fungus and annosum root rot are presented. The prospects and benefits of using DNA analysis for early diagnosis of plant diseases without isolation of the pathogen in pure culture, shortening time of analysis, and the possibility of mass screening are discussed.

Keywords: *phytopathogens, DNA analysis of phytopathogens, doughnut fungus (Rhizina undulata Fr. 1815), annosum root rot (Henerobasidion annozum (Fr.) Breff 1889), fusariosis, phomosis, forest stands, nurseries, Russian Federation.*