УДК 632.4:630*165.3

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА ВОЗБУДИТЕЛЕЙ МИКОЗОВ ЛЕСНОГО ПОСАДОЧНОГО МАТЕРИАЛА, ПЕРЕНОСИМЫХ НАСЕКОМЫМИ

© 2014 г. С. В. Пантелеев, О. Ю. Баранов
Институт леса Национальной академии наук Беларуси
Республика Беларусь, 246001, Гомель, ул. Пролетарская, 71
E-mail: stasikdesu@mail.ru, betula-belarus@mail.ru
Поступила в редакцию 31.07.2014 г.

Рассмотрены аспекты применения молекулярно-генетических методов в диагностике видового состава микромицетов в тканях насекомых с целью выяснения роли последних в качестве переносчиков возбудителей основных заболеваний древесных видов в лесных питомниках. Установлено, что насекомые являются одним из потенциальных факторов переноса и распространения ряда фитопатогенных грибов, в частности представителей родов *Cladosporium* и *Alternaria*.

Ключевые слова: *ДНК, ПЦР, посадочный материал, Cladosporium, Alternaria.*

В процессе питания помимо нанесения прямого ущерба растению насекомые представляют косвенную угрозу, выступая в качестве переносчиков инфекционных агентов для многих растительных видов. При этом перенос возбудителя может происходить как неспецифическим (на внешних покровах и в кишечном тракте), так и специфическим путями (на специализированных структурах) (Воронцов, 1982). Таким образом, насекомые-фитофаги являются потенциальными источниками инфекции.

Основными характеристиками данного способа переноса патогенов являются высокая скорость распространения заболеваний, поражение как ослабленных, так и здоровых растений, возможность перемещения болезнетворных микроорганизмов на значительные расстояния и наличие видовой специализации возбудителей к переносчикам.

В имеющихся литературных источниках представлено незначительное количество исследований в области трансмиссивных заболеваний лесных пород, а данные о переносе насекомыми фитопатогенных агентов являются разрозненными и неполными, что связано с отсутствием до настоящего времени соответствующих методов анализа, позволяющих выполнять диагностику фитопатогенов у насекомых (Zhou et al., 2004; Persson et al., 2009).

В настоящее время в лесном хозяйстве Беларуси отсутствуют данные о возможности распространения насекомыми возбудителей микозов лесных пород, что не позволяет в должной мере обеспечивать выявление и мониторинг потенциальных источников инфекции и осуществлять контроль эффективности проведения профилактических и карантинных мероприятий.

Цель работы – молекулярно-генетическая диагностика и идентификация возбудителей трансмиссивных грибных заболеваний в лесных питомниках.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Экспериментальный материал собран на территории пяти лесных питомников: Калинковичского, Мозырского опытного, Светлогорского, Быховского и Могилевского лесхозов и представлен насекомыми из четырех отрядов: Перепончатокрылые (Hymenoptera), Двукрылые (Diptera), Жесткокрылые (Coleoptera), Полужесткокрылые (Hemiptera) в общем количестве 200 шт., по 40 образцов с каждого объекта. Собраны также образцы пораженных тканей сеянцев ели ев-

ропейской (*Picea abies* (L.) Karst.), сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.), туи западной (*Thuja occidentalis* L.), пихты сибирской (*Abies sibirica* L.), лиственницы европейской (*Larix decidua* Mill.) в общем количестве 200 образцов. Экспериментальный материал растений представлен хвоей с разной степенью поражения – от локального до полного побурения листовой пластинки.

Методика исследования основывалась на использовании различных типов ДНК-маркеров, включая проведение секвенирования ДНК-локусов фитопатогенов.

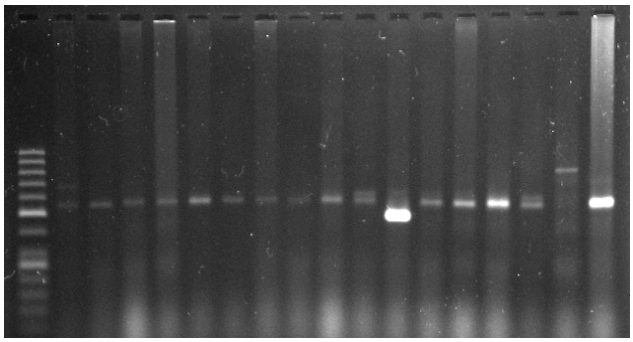
На основании проведенного сравнительного изучения пяти различных вариантов выделения ДНК из насекомых использован модифицированный CTAB-метод (Падутов, 2007). Амплификация маркерных регионов рибосомальной ДНК грибов проводилась методом полимеразной цепной реакции с использованием ПЦР-смеси PCR Green Mix (2X) (Fermentas, Литва) согласно протоколу фирмы-изготовителя. В качестве области амплификации выбран регион рибосомальной ДНК 18S rRNA – ITS1 – 5,8S rDNA – ITS2 – 28S rRNA. Для проведения реакции амплификации использовались праймеры ITS1, ITS4 (White, 1990). Анализ продуктов амплификации производился путем электрофоретического фракционирования в 1,5%-м агарозном геле с последующим окрашиванием бромистым этидием. Для видовой идентификации грибов анализируемые ПЦР-зоны секвенировали с применением генетического анализатора ABI Prism 310 (Applied Biosystems) и набора BigDye Terminator Sequence Kit v.1.1 согласно протоколу компании-изготовителя. Нуклеотидная структура секвенированных ампликонов грибов анализировалась с помощью программы BLAST в международном генном банке NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе ПЦР-анализа, направленного на выявление в тканях насекомых грибной ДНК, получен электрофоретический спектр ампликонов, характеризующийся наличием нескольких фракций различной интенсивности в диапазоне от 520 до 2000 пар нуклеотидов. Полученные данные свидетельствовали о присутствии в исследуемых образцах одного и более видов грибов. При этом наряду с превалирующими вариантами ампликонов в ряде образцов отмечено присутствие нескольких минорных фракций, что указывало на наличие в данных пробах одновременно доминирующих и нескольких сопутствующих видов в следовых количествах.

Альтернативные варианты ампликонов отобраны для проведения секвенирующей реакции. По результатам секвенирования ампликонов, выявленных в исследуемых образцах насекомых, получены следующие данные.

По результатам анализа в Калинковичском лесхозе у 85 % образцов насекомых идентифицирован гриб *Cladosporium* sp., близкий по генетической структуре *Cl. cladosporioides* (Fresenius) de Vries (сходство нуклеотидной последовательности составило 98 %). Данный вид присутствовал в образцах представителей всех четырех исследуемых отрядов: Перепончатокрылые, Двукрылые, Жесткокрылые, Полужесткокрылые. Идентифицированный гриб является возбудителем кладоспориоза (оливковой плесени) широкого спектра лесных и сельскохозяйственных видов, поражающим растение на всех этапах развития – от семени до взрослого дерева. В единичных случаях у представителей отряда Двукрылые выявлен гриб *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl., который является возбудителем альтернариоза (сухой пятнистости) многих видов растений (рис. 1).



M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17

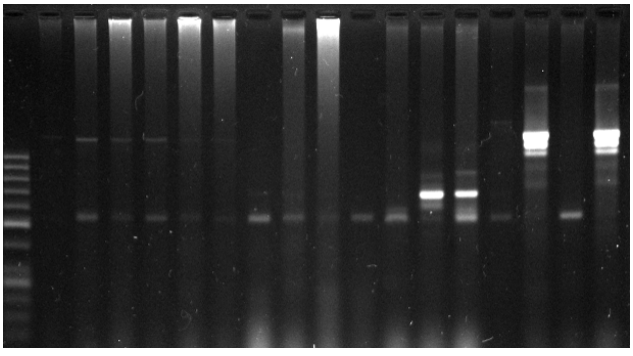
Рис. 1. Фрагмент ПЦР-спектра образцов микромицетов, выделенных у насекомых (Калинковичский лесхоз). 1–10, 12–17 – *Cladosporium* sp.; 11 – *Alternaria alternata*; M – электрофоретический стандарт.

В Мозырском лесхозе у 60 % образцов насекомых отмечены ДНК другого вида рода *Cladosporium*. Данный гриб доминировал у представителей отрядов Жесткокрылые и Полужесткокрылые. В 17 % случаев выявлен гриб *Alternaria* sp., идентифицированный преимущественно у насекомых отрядов Двукрылые и Жесткокрылые. В Светлогорском, Быховском и Могилевском лесхозах практически во всех образцах (в 85–90 % случаев) выявлены грибы рода *Cladosporium*. При этом по данным международного генного банка NCBI, в Светлогорском лесхозе идентифицированный вид на 99 % генетически идентичен *Cl. cladosporioides*, в Быховском и Могилевском – на 98 % *Cl. cladosporioides* и *Cl. herbarum* (Pers.) Link.

В образцах присутствовали также более интенсивно окрашенные фракции ампликонов в диапазоне от 650 п. н. и более, которые являлись результатом амплификации растительной ДНК, что связано с генетическим сходством изучаемых регионов рДНК грибов с гомологичными участками хлоропластной ДНК растений (рис. 2).

На следующем этапе исследования проведен ДНК-анализ микрофлоры пораженных тканей хвои сеянцев и саженцев ряда древесных пород из обследуемых лесных питомников.

В результате молекулярно-генетической диагностики микромицетов в образцах хвои получен многофракционный электрофоретический спектр, характеризующийся наличием фракций разной длины и интенсивности.



М 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17

Рис. 2. Фрагмент ПЦР-спектра образцов микромицетов, выделенных у насекомых (Могилевский лесхоз). 2–11, 13, 14, 16 – *Cladosporium* spp.; 1–6, 12–15, 17 – примесь растительной ДНК; М – электрофоретический стандарт.

При этом в ряде образцов отмечено одновременное присутствие генетического материала двух и более видов грибов.

В Калинковичском, Мозырском и Светлогорском лесхозах Гомельского государственного производственного лесохозяйственного объединения (ГПЛХО) на пораженных сеянцах и саженцах сосны и ели выявлены следующие доминирующие фитопатогены: *Alt. alternata*; *Sclerophoma pithyophila* (Corda) v. Hohn. – возбудитель склерофомоза хвойных. Данный вид поражает в основном молодые растения и в условиях Беларуси является карантинным объектом. Протекание болезни сопровождается отмиранием побегов и ржавчиной хвои; *Rhizoctonia solani* J. G. Kuhn – возбудитель ризоктониоза (окаймленной пятнистости) ряда лесных и сельскохозяйственных растений; *Phoma macrostoma* Mont. и *Phoma* sp. – возбудители фомоза (сухой гнили) широкого спектра растительных видов, нередко диагностируемые в условиях питомников.

В Могилевском и Быховском лесхозах Могилевского ГПЛХО в пораженной хвое ели, сосны и туи выявлены виды: *Cl. herbarum*; почвенный дрожжеподобный гриб *Rhodotorula* sp., часто встречающийся на мертвых растительных остатках; *Alternaria* sp.; *Scl. pithyophila* и *Epicoccum nigrum* Link – возбудитель усыхания хвои и листьев ряда растительных видов.

Сравнительный анализ видового состава фитопатогенных грибов в образцах насекомых и растений показал, что пять видов, выявленных на посадочном материале и относящихся к родам *Cladosporium* и *Alternaria*, присутствуют у насекомых, обитающих на территории лесных питомников.

Проведенное исследование показывает, что насекомые являются одним из потенциальных факторов переноса и распространения возбудителей микозов древесных видов, и подтверждает наличие трансмиссивного механизма передачи возбудителей инфекции (в частности, альтернариоза и кладоспориоза) в лесных питомниках.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Воронцов А. И. Лесная энтомология: Учебник для студентов лесохозяйств. спец. ву-

зов. 4-е изд., перераб. и доп. М.: Высш. школа, 1982. С. 91–149.

Падутов В. Е., Баранов О. Ю., Воропаев Е. В. Методы молекулярно-генетического анализа. Минск: Юнипол, 2007. 176 с.

National Center for Biotechnological Information, NCBI. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/

Persson Y. et al. Fungi Vectored by the Bark Beetle *Ips typographus* Following Hibernation Under the Bark of Standing Trees and in the Forest Litter // Fungal Microbiol. 2009. V. 58. P. 651–659.

White T. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics // PCR protocols: a guide to methods and applications. 1990. P. 315–322.

Zhou X. et al. Epitypication of Ophiostoma galeiforme and phylogeny of species in the *O. galeiforme* complex // Mycologia. 2004. V. 96. N. 6. P. 1306–1315.

Molecular Genetic Diagnostics of Forest Plant Mycosis Agents, Transported by Insects

S. V. Panteleev, O. Yu. Baranov
Institute of Forest, National Academy of Sciences of Belarus
Proletarskaya str., 71, Gomel, 246001 Republic of Belarus
E-mail: stasikdesu@mail.ru, betula-belarus@mail.ru

The aspects of molecular genetic techniques in the diagnostics of fungal species composition in the tissues of insects in order to clarify their role in transport of pathogens of major diseases of forest tree species in nurseries is discussed in the paper. It is established that the insects are one of factors of potential transport and distribution of a number of phytopathogenic fungi, in particular of the genera *Cladosporium* and *Alternaria*.

Keywords: *DNA, PCR, forest planting material, phytopathogen, Cladosporium, Alternaria, transport by insects*.