

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 632.914.2

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ОЧАГОВ КОРНЕВОЙ ГУБКИ В АЛТАЙСКОМ КРАЕ С ПОМОЩЬЮ МЕТОДОВ ДНК-АНАЛИЗА

Д. Н. Шуваев, Л. И. Кальченко

Филиал ФБУ «Рослесозащита» Центр защиты леса Алтайского края
656056, Барнаул, ул. Пролетарская, 61

E-mail: denis.shuvaev@gmail.com, altay-lss@yandex.ru

Поступила в редакцию 06.11.2015 г.

В работе апробированы методы молекулярно-генетической диагностики для идентификации и дальнейшей локализации очагов *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref. s. str. на объектах единого генетико-селекционного комплекса (ЕГСК) и в естественных древостоях сосны обыкновенной Алтайского края. Корневая губка является опаснейшим врагом, способным беспрепятственно распространяться в древостое и вызывать быструю гибель пораженных ею хвойных растений по причине отсутствия у них естественных эффективных механизмов устойчивости. Высокая агрессивность патогена и скорость его распространения требуют соответствующих мер по идентификации и картографированию очагов инфекции. Идентификация корневой губки по плодовым телам обычно затруднена вследствие редкости их образования. Кроме того, установить скрытые границы поражения в усыхающем древостое при таком подходе нельзя. Например, на клоновом архиве сосны обыкновенной Озерского лесничества долгое время не удавалось установить причину усыхания; плодовых тел грибов обнаружено не было, эксперименты по индукции их образования не дали результатов. Только с применением молекулярно-генетического подхода, описанного в данной работе, удалось установить, что причиной усыхания является корневая губка. Преимуществами данного подхода являются быстрота и точность установления диагноза, тогда как традиционные методы весьма трудоемки и длительны. Однако быстрые и точные методы идентификации возбудителя с применением ДНК-маркеров не являются решением проблемы без комплексного описания древостоя, в котором обнаружена инфекция, и мероприятий, которые должны быть направлены на борьбу с ней. Данная работа носит характер предварительного исследования, показывающего применимость данного подхода и знакомящего с начальным этапом на пути детальной локализации обнаруженных очагов инфекции корневой губки.

Ключевые слова: корневая губка, днк-маркеры, идентификация, очаг, локализация, сосна обыкновенная, Алтайский край.

DOI: 10.15372/SJFS20160515

ВВЕДЕНИЕ

Из всего спектра патогенов, атакующих древесные породы, наиболее опасны фитопатогенные грибы (до 90 % причина всех энфитотий). Из них к числу наиболее распространенных и вредоносных для лесных насаждений относятся корневые гнили. Гнили корней хвойных пород во многих странах мира принимают характер энфитотий и наносят огромный ущерб. Гриб

корневая губка *Heterobasidion* spp., вызывающий пеструю ситовую гниль корней хвойных, – один из самых опасных возбудителей заболевания хвойных пород. Эта болезнь хвойных является одной из наиболее разрушительных в Северном полушарии. Корневая губка причиняет ущерб в виде снижения продуктивности древостоев, обесценивания древесины, дополнительных затрат на проведение сплошных санитарных рубок и лесовозобновления из-за резкого

ухудшения общего состояния насаждений (Негрусский, 1986). Связанные с данным патогеном экономические потери для Европы оцениваются в 800 млн евро в год (Asiegbu et al., 2005). Для Российской Федерации расчеты экономического ущерба, связанного непосредственно с корневой губкой, вероятно, сильно занижены, и реальное распространение очагов болезни значительно превышает известную из статистики площадь по причине скрытого характера развития данного заболевания (Павлов и др., 2008б).

Сведений о распространении видов комплекса *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref. s. l. в Сибири недостаточно, и они носят только предположительный характер. Идентификация биологического вида с помощью метода скрещивания или молекулярно-генетических методов, распространение и экология видов *Heterobasidion* на территории России изучены недостаточно и только в некоторых районах. На Урале в смешанных насаждениях *Abies sibirica* и *Picea obovata* идентифицирован вид, относящийся к группе S (*H. parviporum*) (Korhonen et al., 1997). Этот вид определен и на Алтае (Dai et al., 2003). Там же, на Алтае, в насаждениях *Pinus sylvestris* идентифицирован *H. annosum* s. str. (группа P), что до настоящего времени считается его восточной границей распространения в Евразии (Павлов и др., 2008а). В естественных условиях обильное образование плодовых тел корневой губки встречается крайне редко (Федоров, 1984; Негрусский, 1986), что во многом усложняет диагностику заболевания. Для образования плодовых тел требуется комплекс определенных условий: свободный доступ воздуха, влажность, затененность (Василяускас, 1989). Жаркий, непродолжительный и зачастую засушливый летний период на территории сосняков Сибири не способствует обильному плодоношению гриба (Павлов и др., 2008а).

Инфекция корневой губки способна к очень длительному существованию в очаге. Следовательно, в дальнейшем при проведении лесовосстановления, рубок ухода участки будут нуждаться в специальных технологиях для предотвращения развития патогена. Для этого необходимо формирование базы данных по очагам корневых патогенов с указанием точных географических координат (Павлов и др., 2008б). Молекулярно-генетический анализ с применением видоспецифических праймеров позволяет вне зависимости от наличия плодовых тел быстро идентифицировать генетический материал корневой губки, что дает возможность в более

короткие сроки составить карту встречаемости данного вида фитопатогена и определить границы его распространения в древостое. Цель данной работы – показать, что молекулярно-генетический анализ с применением видоспецифических праймеров позволяет вне зависимости от наличия плодовых тел быстро идентифицировать генетический материал корневой губки, что дает возможность в более короткие сроки составить карту встречаемости очагов данного патогена и в дальнейшем определить границы его распространения в древостое сосны обыкновенной.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для исследования послужили образцы корней усыхающих и визуально здоровых деревьев сосны обыкновенной, собранные из 10 лесничеств Алтайского края. Были отобраны деревья с внешними признаками поражения корневой гнилью: ажурностью кроны, пожелтением и укорачиванием хвои, смолотечением. Также в непосредственной близости от предполагаемых очагов были взяты образцы корней визуально здоровых деревьев.

Все работы по пробоподготовке образцов вели с соблюдением условий стерильности. Необходимые инструменты при работе с новым образцом протирали ватой, смоченной в 70%-м спирте. Посуду стерилизовали при жестком ультрафиолетовом облучении в течение 15 мин, чтобы снизить вероятность контаминации образцов и реагентов.

Пробоподготовка заключалась в том, что каждый образец корня высверливали в 4–5 местах, избегая просмоленных участков, формируя комплексный образец из древесной стружки одного корня. ДНК из образцов экстрагировали согласно модифицированным протоколам выделения ДНК из пораженных растений (разработка ИЛ НАНБ, Республика Беларусь).

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) ставили с парой видоспецифических праймеров HetF и HetR (разработка ИЛ НАНБ, Республика Беларусь) (табл. 1). Данные праймеры фланкируют 5.8S-рДНК, включая переменные участ-

Таблица 1. Видоспецифические праймеры HetF и HetR

Праймер	Последовательность нуклеотидов
HetF	5'-CCG-AGC-CGC-GTC-TTC-TCA-CA-3'
HetR	5'-GGC-GGC-ACC-ACA-AGG-GTC-TC-3'

ки спейсеров ITS1 и ITS2 (internal transcribed spacer) (PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, 1990). Ожидаемая длина ампликона составляет 346 баз. Объем ПЦР-смеси составил 20 мкл: деионизированная вода – 13.6 мкл; ПЦР-смесь (ScreenMix-HS, ЗАО Евrogen) – 4 мкл; праймеры HetF и HetR – по 0.8 мкл; образец ДНК – 0.8 мкл.

Конечные концентрации праймеров составили 0.16 пМ/мкл. ПЦР ставили на термоциклере ABI 9700 (Applied Biosystems, США). Режим амплификации был следующим: первоначальная стадия денатурации при 95 °С в течение 5 мин, затем 32 цикла, каждый из которых включал 3 этапа: денатурацию при 95 °С в течение 15 с, отжиг при 62 °С – 20 с, элонгацию при 72 °С – 1 мин. Последние стадии – элонгация при 72 °С – 3 мин и хранение при 4 °С. Электрофоретическое разделение продуктов амплификации проводили в горизонтальных камерах Helicon «SE-2» в однократном TBE-буфере (трис-боратный электродный буфер) в 1%-м агарозном геле. Условия электрофоретического разделения: напряжение тока – 250 В, мощность тока – 10 Вт, время электрофореза – 1.5 ч. Амплифицированный генетический материал визуализировали посредством окраски геля в растворе бромистого этидия с последующей проявкой на трансиллюминаторе ECX-F20.M (Vilber Lourmat, Франция). Интерпретация результатов анализа в данном случае сводилась к регистрации наличия (+) или отсутствия (–)

специфических полос на электрофореграмме, т. е. генетического материала корневой губки в данном образце.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

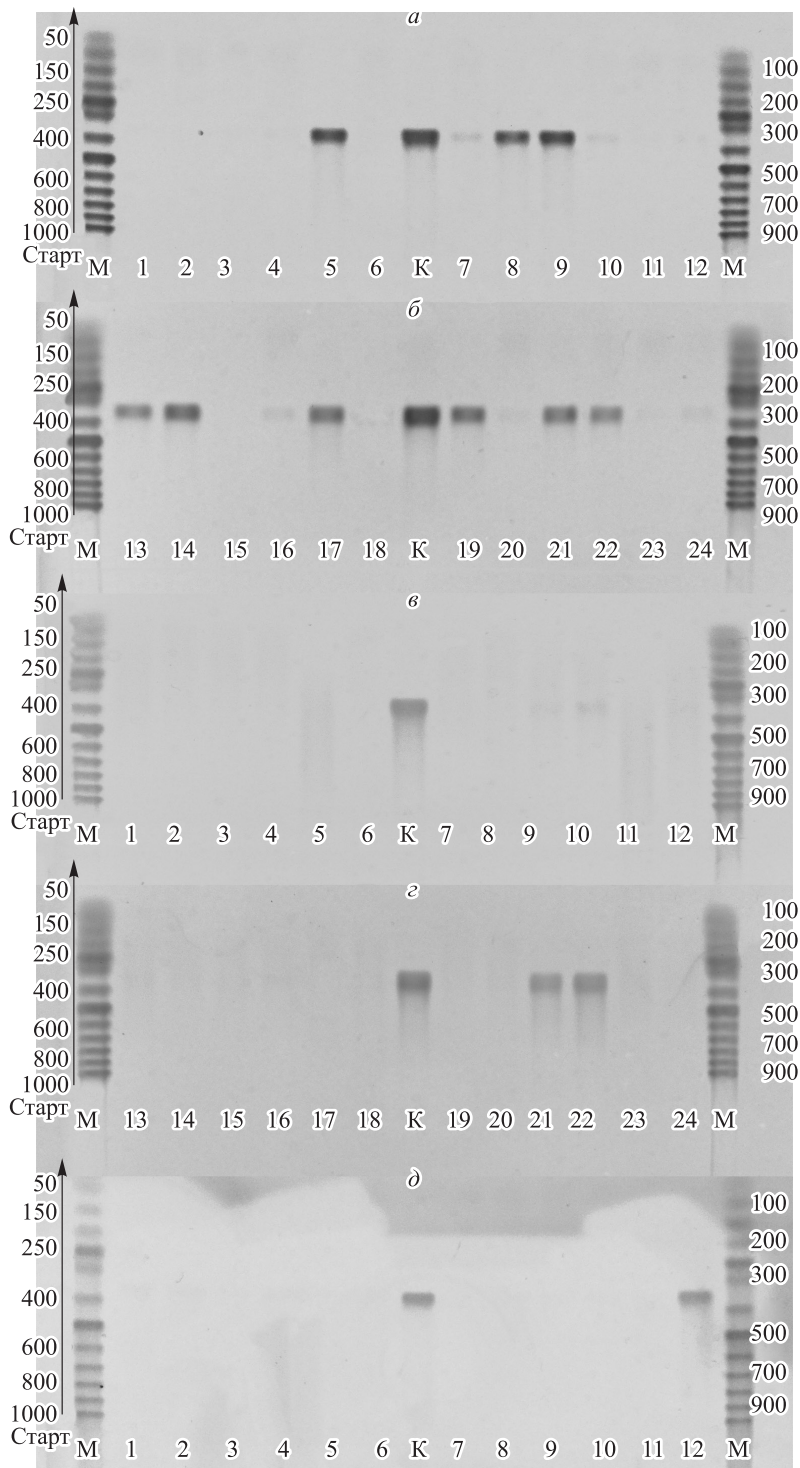
Всего обследовано 46 деревьев сосны обыкновенной. Из них генетический материал корневой губки обнаружен в образцах корней 12 деревьев из трех лесничеств и дополнительно – из двух лесничеств, где рядом были обнаружены плодовые тела грибов, но в корнях ДНК патогена не обнаружена (табл. 2, см. рисунок).

Отрицательные результаты анализов на присутствие ДНК патогена в корнях сосны обыкновенной из Барнаульского и Бийского лесничеств можно объяснить сильной засмоленностью образцов, что привело к ингибированию реакции ПЦР (см. рисунок). Поэтому лучше отбирать корни, имеющие признаки легкой и средней степени поражения.

В целом результаты данного исследования обнадеживают, поскольку традиционный фитопатологический анализ, основанный на изучении имеющихся явных симптомов проявления болезни, не позволяет проводить раннюю диагностику. Наблюдения могут носить длительный характер, а постановка диагноза в значительной степени субъективна, поскольку сходные симптомы заболеваний могут быть вызваны различными видами патогенных организмов или абиотическими факторами. Например, как уже

Таблица 2. Результаты анализа образцов пораженной древесины корней сосны обыкновенной на предмет присутствия генетического материала корневой губки

Лесничество	Участковое лесничество	Наличие (+)/отсутствие (–) генетического материала корневой губки
Барнаульское	Барнаульское	+ (плодовое тело)
Белокурихинское	Белокурихинское	–
Волчихинское	Правдинское	–
	Волчихинское	+
	Максихинское	–
Шипуновское	Белоглазовское	–
Бобровское	Бобровское	+
Петровское	Озеро-Петровское	–
	Заводское	–
Кулундинское	Шарчинское	–
	Вылковское	–
	Гоноховское	–
Бийское	Бийское	+ (плодовое тело)
Озерское	Озерское	+
Озеро-Кузнецовское	Павловское	–



Электрофореграммы фрагментов ITS-локусов корневой губки в агарозном геле, которые обнаружены в образцах ДНК древесины корней сосны обыкновенной: *a-б* – Бийское и Озерское лесничества; *в-г* – архив клонов сосны обыкновенной (АК96) из Озерского, Волчихинского, Кулундинского, Озеро-Кузнецовского, Шипуновского и Петровского лесничеств; *д* – Белокурихинское, Петровское, Барнаульское, Кулундинское, Бобровское лесничества; цифры 1–12, 13–24 – порядковые номера образцов корней; М – маркер молекулярной массы (50–1000 баз); К – контроль (ITS-фрагмент ДНК из плодового тела корневой губки).

отмечено выше, в Озерском лесничестве долгое время не удавалось установить причину усыхания деревьев на архиве клонов сосны обыкновенной 1996 г., пока не применили новый метод и не установили, что причиной усыхания является корневая губка.

Данная работа по идентификации корневой губки в древесине корней сосны обыкновенной может быть проведена всего за 3 дня без значительных трудозатрат при высокой точности самого анализа. Эти преимущества дают возможность ранней диагностики болезни, которую иногда невозможно идентифицировать традиционными методами.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, по результатам обследования древостоев сосны обыкновенной из 10 лесничеств Алтайского края, включая один объект ЕГСК (архив клонов из Озерского лесничества), были идентифицированы деревья, зараженные корневой губкой. В дальнейшем данная информация послужит отправной точкой для локализации очагов инфекции и позволит в короткие сроки установить скрытые границы ее распространения. Схемы очагов заражения, составленные на данной основе, позволят рационально спланировать направление санитарных рубок, изымая при этом пораженные деревья и сохраняя здоровые. Методы, использованные в данной работе, дают возможность определить корневую губку в древесине визуальными методами здоровых сосен, оценить санитарное состояние отдельных деревьев, что, в свою очередь, позволит принять своевременные меры по сохранению товарности древесины, а также объективно определить границы очага заражения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Василяускас А.* Корневая губка и устойчивость экосистем хвойных лесов. Вильнюс: Мокслас, 1989. 175 с.
- Негруцкий С. Ф.* Корневая губка. М.: Агропромиздат, 1986. 194 с.
- Павлов И. Н., Корхонен К., Губарев П. В., Черепнин В. Л., Барабанова О. А., Миронов А. Г., Агеев А. А.* Закономерности образования очагов *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref. s. str. в географических культурах сосны обыкновенной (Минусинская котловина) // Хвойные бореальной зоны. 2008а. Т. XXV. № 1–2. С. 28–36.
- Павлов И. Н., Рухуллаева О. В., Барабанова О. А., Агеев А. А.* Оценка роли корневых патогенов в ухудшении состояния лесного фонда Сибирского федерального округа // Хвойные бореальной зоны. 2008б. Т. XXV. № 3–4. С. 262–268.
- Федоров Н. И.* Корневые гнили хвойных пород. М.: Лесн. пром-сть, 1984. 160 с.
- Asiegbu F. O., Adomas A., Stenlid J.* Conifer root and butt rot caused by *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref. s. l. // Mol. Plant. Pathol. 2005. V. 6. N. 4. P. 395–409.
- Dai Y.-C., Vainio E. J., Hantula J., Niemelä T., Korhonen K.* Investigations on *annosum* s. lat. in central and eastern Asia with the aid of mating tests and DNA fingerprinting // For. Pathol. 2003. V. 33. N. 5. P. 269–286.
- Korhonen K., Fedorov N. I., La Porta N., Kovbasa N. P.* *Abies sibirica* in the Ural region is attacked by the S type of *Heterobasidion annosum* // Eur. J. For. Path. 1997. N. 27. P. 273–281.
- PCR protocols: a guide to methods and applications / Ed. by M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, T. J. White. New York: Acad. Press, 1990. 482 p.

IDENTIFICATION OF *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref s. l. PESTHOLES IN ALTAI KRAI BY THE METHODS OF DNA-ANALYSIS

D. N. Shuvaev, L. I. Kalchenko

*Branch of the Russian Centre for Forest Protection Center for Forest Protection of Altai Krai
Proletarskaya str., 61, Barnaul, 656056 Russian Federation*

E-mail: denis.shuvaev@gmail.com, altay-lss@yandex.ru

In this work was tested method of DNA-diagnostic for identification and further localization of pest holes of *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref s.l. *Heterobasidion annosum* is dangerous enemy for coniferous trees because they have no effective natural resistance against this pathogen. Therefore it can easily spread in stand and be the cause of its death. The most aggressive and rate of spreading of pathogen require appropriate events for identifying and mapping of infectious holes. Identification of *H. annosum* by fruit bodies is usually difficult because of the rarity of their formation. Furthermore, this method cannot allow determination of the hidden infectious borders in the dying stand. For example, in the clone bank of *Pinus sylvestris* from Ozersky forestry during long time attempts to determine causes of trees' death were unsuccessful because fruit bodies weren't found there and the experiments for induction of fruit bodies also yielded nothing. We have applied the method of DNA-analysis and identified that the cause of trees' death was *H. annosum*. The rapidity and accuracy are advantages of DNA-diagnosis while the conventional methods are time-consuming. However, DNA-markers aren't a panacea without a complete description of the stand infected by pathogen and the events aimed against it. This is a preliminary study where we wanted to demonstrate applicability of the method and began the first stage for further detail localization of pestholes.

Keywords: *Heterobasidion annosum*, DNA-markers, identification, pestholes, localization, *Pinus sylvestris*, Altai Krai.

How to cite: Shuvaev D. N., Kalchenko L. I. Identification of *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref s. l. pestholes in Altai Krai by the methods of DNA-analysis // *Sibirskij Lesnoj Zhurnal* (Siberian Journal of Forest Science). 2016. N. 5: 147–152 (in Russian with English abstract).