

РАЗРАБОТКА ПРАЙМЕРОВ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ ПАРАЗИТИЧЕСКИХ ГРИБОВ РОДА *RHYTISMA*

С.Г. Ржевский, А.М. Кондратьева

*ФГБУ Всероссийский научно-исследовательский институт лесной генетики, селекции
и биотехнологии, г. Воронеж, Россия*

Аннотация. В данной работе представлен обзор паразитических грибов рода *Rhytisma*, встречающихся на территории России: *Rhytisma acerinum* (Pers.) Fr., *Rh. punctatum* (Pers.) Fr., субстратом для которых служат различные виды клена, *Rh. salicinum* (Pers.) Fr., паразитирующего на ивах и *Rh. andromedae* (Pers.) Fr. – на подбеле. Аскомицеты данного рода являются возбудителями черной (смоляной) пятнистости листьев, наносящей ущерб декоративным качествам растений, и в то же время могут они служить индикаторами экологической обстановки. Виды ритисмы, субстратом для которых служат листья клена, широко распространены в Воронеже и его окрестностях. Целью данной работы являлась разработка на основе имеющихся в базе данных NCBI сиквенсов данных видов специфических праймеров для их молекулярно-генетической идентификации. Для их создания использовалось программное обеспечение Primer-Blast, специфичность полученных последовательностей проверялась *in silico* посредством модуля BLAST на сайте NCBI. Среди сгенерированных последовательностей праймеров был произведен отбор на соответствие оптимальным параметрам. Использование молекулярно-генетического анализа с данными праймерами может найти применение для ранней диагностики возбудителей, а также в других случаях затруднений морфологического определения видов фитопатогенов.

Ключевые слова: ритисма, ascomycota, *Acer*, *Salix*, *Andromeda*.

DEVELOPMENT OF PRIMERS FOR IDENTIFICATION OF PARASITIC FUNGI OF THE GENUS *RHYTISMA*

S.G. Rzhevsky, A.M. Kondratyeva

*FSBI All-Russian Research Institute of Forest Genetics, Breeding and Biotechnology,
Voronezh, Russia*

Abstract: This paper provides an overview of parasitic fungi of the genus *Rhytisma* found in Russia: *Rhytisma acerinum* (Pers.) Fr., *Rh. punctatum* (Pers.) Fr., the substrate for which is various types of maple, *Rh. salicinum* (Pers.) Fr., parasitizing willows and *Rh. andromedae* (Pers.) Fr. – on the *Andromeda sp.* Ascomycetes of this genus are the causative agents of black (tar) leaf

spot, which damages the decorative qualities of plants, and at the same time, they can serve as indicators of the ecological situation. Types of rhytisma, for which maple leaves serve as a substrate, are widespread in Voronezh and its environs. The goal of this work was to develop, based on the sequences of these species available in the NCBI database, specific primers for their molecular genetic identification. Primer-Blast software was used to create them, and the specificity of the obtained sequences was checked in silico using the BLAST module on the NCBI website. Among the generated primer sequences, selection was made to match the optimal parameters. The use of molecular genetic analysis with these primers can be used for early diagnosis of pathogens, as well as in other cases of difficulties in the morphological determination of plant pathogen species.

Keywords: *Rhytisma*, ascomycota, *Acer*, *Salix*, *Andromeda*.

Введение

Представители рода *Rhytisma* – паразитические аскомицеты класса Leotiomycetes, поражающие листья деревьев и трав. По итогам филогенетических исследований было предложено рассматривать семейство Rhytismataceae *sensu stricto*, включая в него восемь родов: типовой род *Rhytisma*, а также роды *Lophodermina*, *Placuntium*, *Xyloma*, *Densorhytisma*, *Fanglania*, *Johnstoniella* и *Shiqia*.

Виды ритисмы проявляются крупными черными стромами на живых листьях с одной или несколькими погруженными апотециальными аскоматами, которые прорываются через внешние слои (название таксона происходит от греч. *rutís* – «морщина»). На данный момент для рассматриваемого рода предложено множество видов и внутривидовых таксонов, однако только меньшая часть из них утверждены, в остальном вопросы их классификации остаются спорными [1].

На территории России встречаются, как минимум, следующие представители данного рода: *Rhytisma acerinum* (Pers.) Fr. (ритисма кленовая), *Rh. punctatum* (Pers.) Fr. (ритисма точечная), *Rh. salicinum* (Pers.) Fr. (ритисма ивовая), *Rh. andromedae* (Pers.) Fr. Первые два из них паразитируют на различных представителях клена, третий – на иве, четвертый – на травянистых растениях родов *Andromeda* (подбел), *Kalmia*, *Lyonia*, *Pieris* [2].

Грибы данного рода являются возбудителями черной пятнистости листьев (смоляной пятнистости, англ. «tar spot»). Заражение проявляется в том, что летом на листьях возникают желтые пятна, которые темнеют, ближе к осени становясь черными, с желтым ободком. Пятна, образуемые на листьях *Rh. punctatum*, содержат характерные структуры из рассеянных черных точек (в то время как у *Rh. acerinum* они являются сплошь черными, с выпуклыми лабиринтообразными структурами) [3]. Ритисмы, поражающие ивы и подбел, также проявляются обширными выпуклыми черными пятнами с морщинистой поверхностью. Как и некоторые другие паразиты растений, ритисмы могут служить биологическим индикатором условий среды. Атмосферные примеси, в частности сернистый газ, снижают распространенность данного патогена [4].

В результате проведенного мониторинга в Воронежской области *Rh. acerinum* и *Rh. punctatum* обнаружены на листьях *A. platanoides* L. [5]. Вид *Rh. andromedae* в ходе исследования верховых болот таежной зоны Западной Сибири был выявлен листьях на

Andromeda polifolia L. [6]. *Rh. salicinum* найдена на листьях *Salix* sp., на берегу р. Мульпа в Ботчинском заповеднике в Хабаровском крае [7] а также на территории Ханты-Мансийского Автономного округа – Югры [8].

Цель исследования. Данное исследование было выполнено с целью разработки специфических праймеров для определения выше рассмотренных видов рода *Rhytisma*. Несмотря на то, что зрелые формы ритисмы имеют специфическую морфологию и довольно легко определяются по визуальным признакам, на ранних и промежуточных стадиях развития данные патогены могут иметь неясное проявление на фоне других видов пятнистости. В таком случае уместно применение молекулярно-генетических методов определения возбудителей, в частности с помощью ПЦР со специфическими праймерами. Данный метод может также понадобиться и при исследовании биоматериала, подвергнутого заморозке, высушиванию и другим методам фиксации, затрудняющим морфологическое определение патогенов.

Материалы и методы. Таксономия и систематика грибов сверялась по базе данных «MycBank» [9]. Для идентификации грибов разрабатывались праймеры на основе ITS1 и ITS2 (Internal transcribed spacer – внутренние транскрибируемые спейсеры), а также 5,8S, 12S, 18S и 28S рРНК. Последовательности ДНК рассматриваемых возбудителей были взяты из базы данных Национального центра биотехнологической информации (NCBI – The National Center for Biotechnology Information) [10] (Таблица 1).

Таблица 1. Последовательности нуклеотидов представителей *Rhytisma*

<p><i>Rhytisma acerinum</i> internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence</p>	<p>gccggccaga ggtcccaaa ccccggaatc cgtgccgtct gactaccacg caatcgcgaa aaacttcaa caacggatct cttggtccg gcatcgatga agaacgcagc gaaatgcgat aagtaatgtg aattgcagaa ttccgtgaat catcgaatct ttgaacgcac attgcgcccc ctggcttcc agggggcatg cctgttcgag cgtcattaca accctcaagc cccggcttgg tcttgggccc gccatcatg gcccgcctca aaagcagtgg cggccccgtc cggctcaag cgtagtacta ctcgtcgctt gtcgggctcg ggcggcggcc ggccagcaag cccctcacac accaggttga cctcgatca ggtagggata cccgctg</p>
<p><i>Rhytisma punctatum</i> isolate WA-1 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence</p>	<p>gccggcccaa agacccaac ctcttgaatc tgtgccgtct gactggaacg caaatcgtga aaaacttca acaacggatc tcttggttct ggcatcgatg aagaacgcag cgaatgcga taagtaatgt gaattgcaga attcgtgaa tcatcgaatc ttgaacgca cattgcgccc tctggatttc ctgggggcat gcctgttcga gcgctcattac aaccctcaag cgcagcttgg tgttgggctt gccggatag gctcgcctca aagtcagtgg cggcggcgtc cggctcaag cgtagtacta ctcgtcgctt ggtgggctg ggcggcggc cggccagcaa ccccattta tctcggttga cctcgaatca ggtagggata cccgctg</p>

<p><i>Rhytisma andromedae</i> voucher Lantz 438 (UPS) 12S small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; mitochondrial</p>	<p>ttgggggat gtatagtact cttatgagc tagttgtgtt tgaataaaa gtaaatcgtt ataaaataaa cataacacca actacgttgg ataaaattct agatagaata cttattatga ctattttcta tctatatgtc ttgaccaaact tacgtgccag cagtcgaggc aatacgtaga agactagtgt tattcatctt tactagggtt aaagggacc tagacgggtat tattaagcca cctctcttt gctagagga aggcaaatat ttactagag ttaaatgtaa gaagggagaa tttaggtgt agagatataa ttcgttgata ctctgaagac tggtaatggc gaaagcacc ttctatgtaa taactgacgt taagggacga aggcttgggg cgcaaccagg attagatacc ctattagcc atgcagataa ttatgaatgc catagactag atataattha gttataaat gaaagttaa gcaatccacc tcaagagtac tgtggcaacg ctggaactga aatcattaga ccgcttctga gaacagtagt gaagcatgtt atataatccg atagccctcg taaaacctta ccacaacttg aatgggtgcc tctttcttt agcgaagcaa atcgctttt tcttactgt tgctcagct ctctgggtgcc ctacccttt gctttgctag ggtaagggca aagaagcgca aggcataca aggtctctct agataagat gccttgcaag gccagagaga gaggggtctt tgcccctta gaagcaaacc cctctcatg gggctttgct tctagagcaa aagaagagat attaaattaa agggatgta caggtgtgc acggtgtct tcagctaattg tcgtgagatt gtggttagt ccataaaatt agcgtaaacc ccggctttat ttttaatta ttatgataaa gtagttcgc tgtatattga taaatgataa cagggaaaag ac</p>
<p><i>Rhytisma salicinum</i> voucher BPI843549 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence</p>	<p>cattaaagaa ttggatgac tctgcgtccc attctcacc tatgtttatt aaacctcagt tgctttggcc gtcatacagc cggccaaagg accctgaact cttgaattat tgctgtctga gtatatataa caatcgtaa aacttcaac aacggatctc ttggtcttg catcgatgaa gaacgcagcg aaatgcgata agtaatgtga attgcagaat tcagtgaatc atcgaatctt tgaacgcaca ttgcgccctc tggattccg gggggcatgc ctgttcgagc gtcattacaa ccctcaagca acgcttgatg ttaggcctgc cttgattggc ggcgcctaaa agaagtggcg gctccgtcca gtctcaagcg tagtaatact cgccactgt taggcttggg cgagagcttg ccagagaacc cccaatatat atatatatat acacaaggtt gac</p>

Специфические праймеры разрабатывались на основе данных последовательностей при помощи программного обеспечения Primer-Blast [11]. Специфичность разработанных последовательностей праймеров проверялась *in silico* посредством модуля BLAST [12] на сайте NCBI.

Результаты и обсуждение. Подобранные праймеры представлены в таблице 2. Среди сгенерированных праймеров были отобраны максимально удовлетворяющие следующим требованиям: отсутствие повторяющихся элементов и палиндромов, оптимальная длина в диапазоне от 16–25 нуклеотидов, соотношение количества АТ и GC нуклеотидов около 1:1; низкое значение самокоплементарности полученных праймеров [13].

Таблица 2. Характеристики разработанных праймеров к представителям рода *Rhytisma* (Tm – температура плавления праймеров, °С; GC % – содержание GC-оснований, %)

Праймер	Последовательность (5'→3')	Tm	GC%	Само- компл тар- ность	Само- компле ментар ность 3'	Длина продукта, п.н.
<i>Rh. acerinum</i>						
Прямой	CCGTCTGAGTACCACGCAAT	60.11	55.00	4.00	2.00	
Обратный	CCCGACAAGCGACGAGTAG	60.23	63.16	3.00	2.00	292
<i>Rh. punctatum</i>						
Прямой	AATCTGTGCCGTCTGAGTGG	60.04	55.00	4.00	3.00	
Обратный	GCAATTCGCTGCGTTCTTCA	60.11	50.00	4.00	5.00	92
<i>Rh. andromedae</i>						
Прямой	TGACGTTAAGGGACGAAGGC	60.04	55.00	4.00	2.00	
Обратный	GAAGACAACCGTGCAACACC	59.97	55.00	4.00	1.00	508
<i>Rh. salicinum</i>						
Прямой	TACAACCCTCAAGCAACGCT	59.89	50,00	3.00	3.00	
Обратный	TCTCGCCCAAGCCTAACAAG	60.04	55,00	3.00	3.00	120

Заключение

Полученные последовательности праймеров можно использовать для видовой диагностики возбудителей листовых пятнистей растений. В дальнейшем будет проверена эффективность и проведена апробация сконструированных последовательностей на растительном материале с симптомами болезни и без них.

Исследование выполнено в рамках работы по выполнению государственного задания № 5-323 «Молекулярно-генетическая идентификация фитопатогенов сеянцев (саженцев) основных лесобразующих пород».

Список литературы

1. Phylogeny and taxonomy of *Rhytisma*-like species worldwide / Q. T. Wang, M. J. Guo, Lv, T., H. S. Zhou, Wang, S. J. Wang, C. L. Hou // Fungal Diversity. – 2023. – Pp. 1-43.
2. Minter, D. W. *Rhytisma andromedae*. [Descriptions of Fungi and Bacteria] // Descriptions of Fungi and Bacteria. – 1996. – No. 130. – P. 1295
3. Woo, J. Y. The life history and cytology of *Rhytisma punctatum* on bigleaf maple / J. Y. Woo, A. D. Partridge // Mycologia. – 1969. – Vol. 61. – No. 6. – P. 1085-1095.
4. Bevan, R. J. *Rhytisma acerinum* as a biological indicator of pollution / R. J. Bevan, G. N. Greenhalgh // Environmental Pollution. – 1976. – Vol. 10. – No. 4. – Pp. 271-285.
5. Волков, Д. Э. Поражаемость клена остролистного (*Acer platanoides* L.) патогенными грибами в лесных сообществах Воронежской области / Д. Э. Волков, Г. М. Мелькумов, О. М. Сигитова // Современная микология в России. – 2015. – С. 112.
6. Филиппова, Н. В. Изучение сообществ грибов верховых болот таежной зоны Западной Сибири. II. Микробиоты на опаде болотных растений // Микология и фитопатология. – 2015. – Т. 49. – №. 3. – С. 164-172.

7. Богачева, А. В. Новые и интересные находки дискомицетов на территории Хабаровского края // Биота и среда заповедных территорий. – 2018. – №. 2. – С. 41-53.
8. Инфекционные болезни растений семейства Salicaceae на территории Ханты-Мансийского Автономного округа-Югры / Т. А. Макарова, П. Н. Макаров, Н. П. Ревуцкая, Ю. П. Максименко // Вестник Оренбургского государственного университета. – 2015. – № 6 (181). – С. 25-32.
9. “MycoBank“; <https://www.mycobank.org/> (доступно: 25.01.2024).
10. “The National Center for Biotechnology Information“; URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> (доступно: 25.01.2024).
11. “Primer-Blast“; URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi> (доступно: 25.01.2024).
12. “BLAST“ ; URL: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (доступно: 25.01.2024).
13. Конструирование праймеров для ПЦР в программе Primer-BLAST / А. А. Козырева, А. М. Злотина, А. С. Головкин, О. В. Калинина, А. А. Костарева // Трансляционная медицина. – 2021. – 8 (3). – С. 37-52. DOI: 10.18705/2311-4495-2021-8-3-37-52.

References

1. Wang, Q. T. Phylogeny and taxonomy of *Rhytisma*-like species worldwide / Q. T. Wang, M. J. Guo, Lv, T., H. S. Zhou, Wang, S. J. Wang, C. L. Hou // Fungal Diversity. – 2023. – Pp. 1-43.
2. Minter, D. W. *Rhytisma andromedae*. [Descriptions of Fungi and Bacteria] // Descriptions of Fungi and Bacteria. – 1996. – No. 130. – P. 1295
3. Woo, J. Y. The life history and cytology of *Rhytisma punctatum* on bigleaf maple / J. Y. Woo, A. D. Partridge // Mycologia. – 1969. – Vol. 61. – No. 6. – Pp. 1085-1095.
4. Bevan, R.J. *Rhytisma acerinum* as a biological indicator of pollution / R.J. Bevan, G.N. Greenhalgh // Environmental Pollution. – 1976. – Vol. 10. – No. 4. – P. 271-285.
5. Volkov, D. E. Damage to Norway maple (*Acer platanoides* L.) by pathogenic fungi in forest communities of the Voronezh region / D. E. Volkov, G. M. Melkumov, O. M. Sigitova // Modern mycology in Russia. – 2015. – P. 112.
6. Filippova, N.V. Study of fungal communities of raised bogs in the taiga zone of Western Siberia. II. Micromycetes on the litter of marsh plants // Mycology and phytopathology. – 2015. – Т. 49. – No. 3. – Pp. 164-172.
7. Bogacheva, A. V. New and interesting finds of discomycetes on the territory of the Khabarovsk Territory // Biota and environment of protected areas. – 2018. – No. 2. – Pp. 41-53.
8. Infectious diseases of plants of the Salicaceae family on the territory of the Khanty-Mansiysk Autonomous Okrug-Ugra / Makarova T. A., Makarov P. N., Revutskaya N. P., Maksimenko Yu. P. // Bulletin of Orenburg State University. – 2015. – No. 6 (181). – Pp. 25-32.
9. “MycoBank“; URL: <https://www.mycobank.org/> (available: 01/25/2024).

10. “The National Center for Biotechnology Information”; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> (available: 01/25/2024).
11. “Primer-Blast”; URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi> (available: 01/25/2024).
12. “BLAST“; URL: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (available: 01/25/2024).
13. . Design of primers for PCR in the Primer-BLAST program / A. A. Kozyreva, A. M. Zlotina, A. S. Golovkin, O. V. Kalinina, A. A. Kostareva // *Translational medicine.* – 2021. – 8 (3). – Pp. 37-52. DOI: 10.18705/2311-4495-2021-8-3-37-52