

**МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ФИТОПАТОГЕНОВ В ЛЕСНЫХ НАСАЖДЕНИЯХ ВОРОНЕЖСКОЙ ОБЛАСТИ****MOLECULAR-GENETIC ANALYSIS OF PHYTOPATHOGENS IN STANDS OF THE VORONEZH REGION**

**Белякова Н.В.**, кандидат химических наук, инженер 1 категории отдела МЛГР, ФГБОУ ВО «Воронежский государственный лесотехнический университет имени Г.Ф. Морозова» Российская Федерация, г. Воронеж

**Воробьева Е.А.**, начальник отдела МЛГР, Российская Федерация, г. Воронеж

**Сиволапов В.А.**, директор филиала ФБУ «Рослесозащита» - «ЦЗЛ Воронежской области», Российская Федерация, г. Воронеж

**Belyakova N.V.**, PhD, chemistry, engineer of the 1<sup>st</sup> category of the MLGR department FGBOU VO « Voronezh State University of Forestry and Technologies named after G.F. Morozov», Russia, Voronezh

**Vorobyova E.A.**, Head of the MLGR Department, Russia, Voronezh

**Sivolapov V.A.**, Director of the branch of the Federal State Budgetary Institution «Roslesozashchita» – «TSL of the Voronezh Region». Russia, Voronezh

**Аннотация.** В данной работе представлены результаты ДНК – диагностики фитопатогенов на территории Воронежской области. ДНК –диагностика проводилась постадийно: выделение суммарной ДНК из образца методом СТАВ, амплификация маркерных участков фитопатогенных организмов с использованием праймеров ITS1 и ITS4, электрофоретическое разделение полученных ампликонов в 2% агарозном геле с последующим окрашиванием бромистым этидием, определение нуклеотидной последовательности амплифицированных локусов с помощью генетического анализатора ABI Prism 310. В ходе исследования выявлены следующие болезни растений: *Sphaeropsis sapinea*, *Rhizoctoniasolani*, *Cladosporiumherbarum*. Наряду с этим, мы выявили патоген *Neocatenulostroma*, который до 2020 года на территории Воронежской области не обнаруживался. Данное заболевание невозможно определить по фенологическим признакам. Степень поражения патогенами составляла от 15 до 40% в исследуемых образцах. В настоящее время проблема защиты растений от болезней особенно актуальна. Установлено, что наибольший ущерб лесохозяйственной деятельности наносят грибные и инфекционные заболевания. При этом среди фитопатогенов около 97% составляют грибные инфекции, 2% - бактериальные и 1% - вирусные. Таким образом, применение ДНК-анализа для выявления фитопатогенов расширяют перспективы применения системы защиты растений от болезней. ДНК – маркеры можно использовать не только для оценки степени зараженности семян, сеянцев, саженцев и лесных культур, но и в ходе проведения профилактических мероприятий.

**Summary.** This paper presents the results of DNA diagnostics of phytopathogens in the Voronezh region. DNA diagnostics was carried out step by step: isolation of total DNA from the sample by CTAB method, amplification of marker regions of phytopathogenic organisms using primers ITS1 and ITS4, electrophoretic separation of the obtained amplicons in 2% agarose gel followed by staining with ethidium bromide, determination of the nucleotide sequence of the amplified loci ABI Prism 310. The study identified the following plant diseases: *Sphaeropsis sapinea*, *Rhizoctonia solani*, *Cladosporium herbarum*. Along with this, we identified the *Neocatenulostroma* pathogen, which had not previously been found in the territories under its jurisdiction. This disease cannot be determined by phenological signs. The degree of infection by pathogens ranged from 15 to 40%. At present, the problem of protecting plants from diseases is especially urgent. It has been established that the greatest damage to forestry activities is caused by fungal and infectious diseases. At the same time, among phytopathogens, about 97% are fungal infections, 2% are bacterial and 1% are viral.

Thus, the use of DNA analysis for the detection of phytopathogens expands the prospects for the application of the plant protection system against diseases. DNA markers can be used not only to assess the degree of contamination of seeds, seedlings, plantlets and forest crops, but also in the course of preventive measures.

**Ключевые слова:** ДНК –анализ, фитопатоген, *Neocatenulostroma*, GenBank.

**Keywords:** DNA analysis, phytopathogen, *Neocatenulostroma*, GenBank.

Широкое распространение инфекционных болезней растений является актуальной проблемой при выращивании посадочного материала в питомниках. Как известно, что меры по защите сеянцев древесных пород, восстановлению генофонда лесов, представляют собой комплекс весьма дорогостоящих агротехнических мер. Использование фитопатологического мониторинга лесообразующих пород является экономически выгодным по сравнению с организацией мероприятий по оздоровлению лесных культур в питомниках [1].

Наиболее часто в полевых условиях используется визуальный фитопатологический анализ – диагностика болезней лесных культур по внешним признакам – усыхание и пожелтение листьев и хвои, пятнистость. Данный метод не позволяет определить причину возникновения, точно установить возбудителя, он не может быть использован на ранней стадии патогенеза.

В настоящее время самым современным и точным методом, позволяющим безошибочно определить возбудителей лесных болезней, является метод ДНК–диагностики. Молекулярно-генетические методы обследования особенно эффективны для предупреждения увеличения площади поражения вредными организмами и их ранней диагностики. Применение специалистами Рослесозащиты современных молекулярно-генетических методов анализа при фитопатологическом мониторинге играет важную роль в работе лесного хозяйства Российской Федерации [2].

#### **Материалы и методы эксперимента**

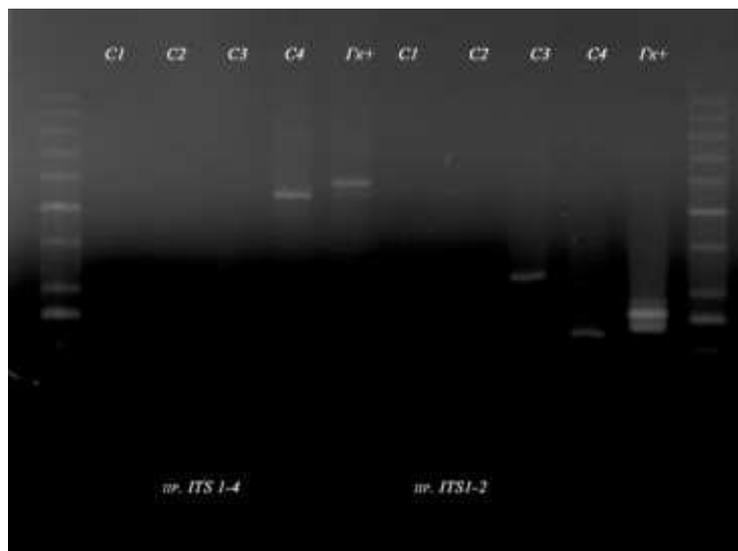
Для молекулярно-генетического анализа в лесничествах и питомниках Воронежской области были отобраны вегетирующие части хвойных и лиственных растений с признаками

поражения патогенами. Анализ осуществлялся постадийно. На первом этапе провели выделение суммарной ДНК из растительного материала СТАВ-методом [3].

Далее для амплификации использовали праймеры ITS1 и ITS4, ITS1 и ITS2. Предварительный анализ продуктов амплификации проводился с помощью электрофоретического фракционирования в 2% агарозном геле с последующим окрашиванием бромистым этидием. Определение нуклеотидной последовательности проводилось с помощью генетического анализатора ABI Prism 310 (AppliedBiosystems, США). Для установления видовой принадлежности выявленных фитопатогенов их нуклеотидная структура была проанализирована с помощью программы BLAST в GenBank NCBI.

### Результаты и обсуждения.

В результате анализа образцов пораженных семян сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris*) был выявлен спектр грибных инфекций. На полученных электрофореграммах образцы инфицированных растений были представлены окрашенными полосами, тогда как в образцах здоровых растений отсутствовали полосы, что означало отсутствие фитопатогенов (рис. 1).



**Рисунок 1.** Электрофореграмма амплифицированных фрагментов ДНК фитопатогенов в образцах сосны обыкновенной с использованием праймеров ITS1-ITS4.

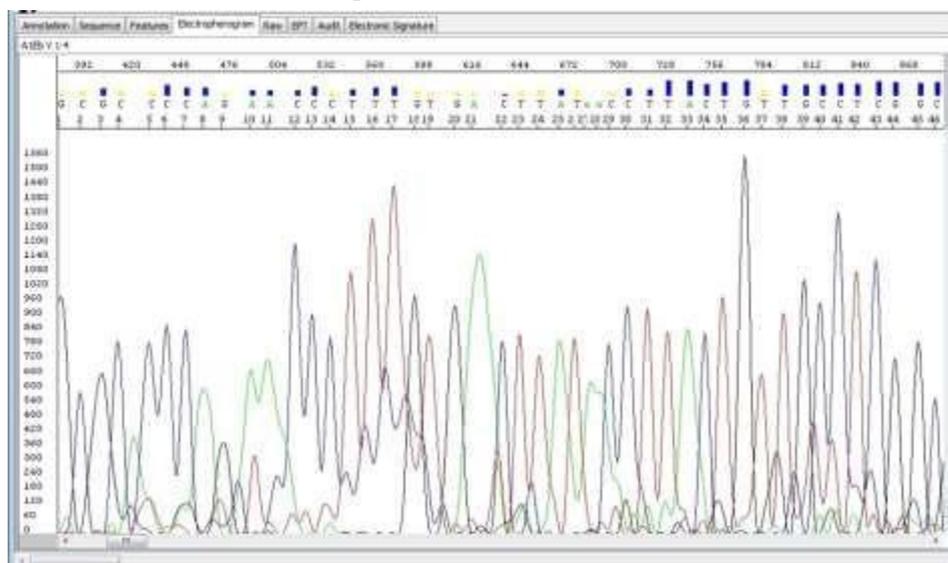
Наиболее часто встречаемым видом из выявленных патогенов является несовершенный гриб *Sphaeropsis sapinea*. Данный патоген вызывает некроз на ветвях, способствует усыханию вершин и боковых побегов, увяданию почек, заболеванию подвержены в основном молодые ослабленные деревья возрасте около 10 лет [4].

Наряду с *S. Sapinea* выявлены грибы *Rhizoctoniasolani*, *Cladosporiumherbarum*, которые поражают в корни и зеленые части растений. А также был выявлен новый вид фитопатогена- *Neocatenulostroma* который ранее не обнаруживался в Воронежской области. Он был обнаружен на сосне обыкновенной в одном из питомников. По литературным данным [5]. *Neocatenulostroma* впервые был идентифицирован в Литве и Украине в 2016 году, в 2017 году был выявлен на территории Белорусии. Также в 2017 году данное заболевание было обнаружено отделом мониторинга состояния лесных генетических

ресурсов ФБУ «Рослесозащита» в Московской области и Республике Крым. В большинстве случаев поражаются растения в насаждениях, молодняках хвойных пород, в питомниках и дендропарках.

Патоген поражает вегетирующие части хвойных растений и вызывает симптомы фитофтороза, усыхание, но не приводит к гибели. По фенологическим признакам невозможно определить данное заболевание. На данный момент можно выявить патоген только с помощью ДНК-анализа. В дальнейшем сотрудники планируют проводить мониторинг данного фитопатогена, чтобы не допустить вспышки очагов распространения данного заболевания.

На рисунке 2 показан сиквенсовый профиль и нуклеотидная последовательность выявленного фитопатогена *Neocatenulostroma* в образце растительного материала с помощью ДНК-анализа на генетическом анализаторе ABI Prism 310.



ATCTACTATAGGGCGAATTCGAGCTCGGTACCCGGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTTGAGTATTCTATAGTGTACSTAAATAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACAATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCA TTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTTCGTAATTGGGCGCTCTCCGCTTCCCTCGCTCACTGAC TCGCTGCGCTCGTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACA GAATCAGGGGATAACGCAAGGAAAGAATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGG CCGGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAATCGACGCTCAAGTCAGA GGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCSCCTGGAAGCTCCCTCGTGCCTCTCCTG TCCGACCCGCTTACCGGATACCTGTCGCTTTCSCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTCTCATAGTSCA CGCTGTAGGTATCCTCAGTT

**Рисунок 2.** Сиквенсовый профиль и нуклеотидная последовательность обнаруженного с помощью молекулярно-генетического анализа патогена *Neocatenulostroma*.

Степень поражения *Neocatenulostroma* составляла 15%, что значительно ниже, чем ранее выявляемыми *Sphaeropsis sapinea* – (40%), *Rhizoctoniasolani* (35%), *Cladosporiumherbarum*, (35%) в исследуемых образцах.

Стоит отметить, что спектр выявляемых грибных болезней растений не является специфичным, в основном, поражению подвергаются ослабленные растения. Первичное ослабление растений связано с действием неблагоприятных факторов, таких как неблагоприятные метеорологические условия, нарушение агротехники выращивания.

## Заключение

Применение методов молекулярно-генетического анализа позволяет выявить патогенные организмы, поражающие лесные насаждения, на ранней стадии, тем самым предупреждая их распространение. Данные меры являются более экономически выгодными по сравнению с проведением лесовосстановительных работ на обширной территории лесных плантаций.

## Список литературы

1. Лесная фитопатология: Учеб. Для студентов специальности «Лесное хозяйство» / Н.И. Федоров. – Мн.: БГТУ, 2004. – 462 с
2. Комплексная программа «БИО – 2020»: состояние и перспективы. Гущин В.А., Шишкина О.К., Шилкина Е.А., Сиволапов В.А.
3. Программа и Методика по пункту 59. План мероприятий («дорожной карты») «Развитие биотехнологий и генной инженерии», утв. Распоряжением Правительства РФ Природопользование от 18 июля 2013г. № 1247 р. Программ и Методика утверждена ФБУ «Рослесозащита» 12.02.2014 [Текст]. – Пушкино, 205 с],
4. Мозолева, Е.Г. Проблема инвазий возбудителей болезней и вредителей древесных растений в Мос-кве / Е.Г. Мозолева, Э.С. Соколова // Сборник материалов круглого стола Всероссийской конференции по экологической безопасности. – М., 2002. – С. 75–76].
5. S.Markovskaja, K. Audrius, K. Davydenko, S. Fraser First record of *Neocatenulostroma germanicum* on pines in Lithuania and Ukraine and its co-occurrence with *Dothistroma* spp. And other pathogens. - *Forest Pathology*. 2016. – 46. P. 522-533. 10.1111/efp.12308.].

## References

1. Forest phytopathology: Study for students of the specialty “Forestry” / N. I. Fedorov. – Mn.: BSTU, 2004. – 462 p.
2. The integrated program “BIO-2020”: the state and prospects. Gushchin V. A., Shishkina O. K., Shilkina E. A., Sivolapov V. A.
3. Program and Methodology for item 59. Action Plan (“road map”) “Development of biotechnologies and genetic engineering”, approved by the Decree of the Government of the Russian Federation Nature Management of July 18, 2013 No. 1247 p. Programs and Methods approved by the Federal State Budgetary Institution “Roslesozashchita” 12.02.2014 [Text]. – Pushkino, 205 s],
4. Mozolevskaya, E. G. the Problem of the invasion of pathogens and pests of woody plants in Moscow / E. G. Mozolevskaya, E. S. Sokolova // Osbornemedia round table conference on environmental safety. – M., 2002. – S. 75-76].
6. S. Markovskaja, Audrius K., K. Davydenko, S. Fraser First record of *Neocatenulostroma germanicum* on pines in Lithuania and Ukraine and its co-occurrence with *Dothistroma* spp. And other pathogens. – *Forest Pathology*. 2016. – 46. P. 522-533. 10.1111/efp.12308.].