

**НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК БЕЛАРУСИ
МИНИСТЕРСТВО ЛЕСНОГО ХОЗЯЙСТВА РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ
НПЦ НАН БЕЛАРУСИ ПО БИОРЕСУРСАМ
ИНСТИТУТ ЛЕСА НАН БЕЛАРУСИ**

**НАУКА – ИННОВАЦИОННОМУ
РАЗВИТИЮ ЛЕСНОГО ХОЗЯЙСТВА**

**МАТЕРИАЛЫ
МЕЖДУНАРОДНОЙ
НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКОЙ КОНФЕРЕНЦИИ
(11-13 ноября 2015 г.)**

Гомель 2015

УДК 630*(476)
ББК 43
П 78

НАУКА - ИННОВАЦИОННОМУ РАЗВИТИЮ ЛЕСНОГО ХОЗЯЙСТВА: Материалы международной научно-практической конференции, посвященной 85-летию Института леса НАН Беларуси, Гомель, 11-13 ноября 2015 г. / Институт леса НАН Беларуси; редколлегия: А.И. Ковалевич [и др.]. - Гомель: Институт леса НАН Беларуси, 2015. – 380 с.

Таблиц – 77, рисунков – 61, библиография – 377 наименования.

ISBN 978-985-6768-27-2

Сборник материалов международной научно-практической конференции «Наука - инновационному развитию лесного хозяйства», посвященной 85-летию Института леса НАН Беларуси, содержит результаты научных исследований ученых в области лесоведения и лесоводства, лесовосстановления и лесоразведения, лесной селекции и генетики, биологии, экологии, радиоэкологии, охраны и защиты леса, побочных лесопользований.

Сборник представляет интерес специалистам лесного хозяйства, сотрудникам НИИ лесного профиля, полезен преподавателям и студентам лесных, биологических и экологических специальностей вузов и колледжей.

Редакционная коллегия: Ковалевич А.И., к.с.-х.н., доцент (отв. редактор); Усеня В.В., д.с.-х.н., профессор (зам. отв. редактора); Баранов О.Ю., к.б.н., доцент; Булко Н.И., к.с.-х.н.; Дворник А.М., д.б.н., профессор; Падутов А.Е., д.б.н., доцент; Падутов В.Е., чл.-корр., д.б.н.; Рожков Л.Н., д.с.-х.н., профессор; Сидор А.И., к.с.-х.н., доцент; Федорук А.Т., д.б.н., профессор; Бордок И.В., к.с.-х.н. (отв. секретарь редколлегии).

Все статьи сборника прорецензированы ведущими учеными институтов государственного научно-производственного объединения «Научно-практический центр НАН Беларуси по биоресурсам», Белорусского государственного технологического университета, Гомельского государственного университета им. Ф. Скорины.

© Институт леса НАН Беларуси, 2015

МОЛЕКУЛЯРНО-ФИТОПАТОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА КЛОНОВ БЕРЕЗЫ, ОСИНЫ И ЯСЕНЯ НА РАЗЛИЧНЫХ ЭТАПАХ МИКРОРАЗМНОЖЕНИЯ

¹Пантелеев С.В., ¹Баранов О.Ю., ²Шестибратов К.А.,
³Гончарова Л.В., ¹Константинов А.В.

¹ГНУ «Институт леса НАН Беларуси»

(г. Гомель, Беларусь)

²ФГБУН «Институт биоорганической химии

имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» РАН

(г. Пущино, Россия)

³ГНУ «Центральный ботанический сад НАН Беларуси»

(г. Минск, Беларусь)

e-mail: pukidesu@gmail.com

*Проведена молекулярно-фитопатологическая диагностика микрофлоры клонов березы, осины и ясеня на этапах микроразмножения и укоренения *in vitro*, и адаптации и доращивания *ex vitro*. Установлено, что способ клонального микроразмножения лесных древесных растений, в частности березы, осины и ясеня, позволяет получать посадочный материал, свободный от инфекционной микрофлоры. Развитие инфекции происходит по причине заражения растений в условиях *ex vitro*.*

В процессе вегетативного размножения растений традиционными способами возникает проблема возрастания инфекционной нагрузки вследствие увеличения количества изначально зараженного материала. Получение стандартного посадочного материала, таким образом, становится трудно выполнимой задачей, так как существует вероятность накопления и передачи инфекции. Данная проблема разрешилась с развитием нового метода вегетативного размножения – клонального микроразмножения, в основе которого лежит получение генетически идентичных клонов в условиях *in vitro*. Успех получения свободного от инфекции материала определяется эффективностью этапа стерилизации, так как внутреннее заражение исходных эксплантов бывает намного сильнее поверхностного. При этом важной составляющей является подбор оптимальных концентраций стерилизующих агентов для сохранения жизнеспособности экспланта.

В процессе адаптации микроклонов после пересадки растений в почву нередко наблюдается остановка в росте, дефолиация и их гибель. Эти явления связаны с факторами как неинфекционной, так и инфекционной природы. В ходе длительного субкультивирования нарушается деятельность устьичного аппарата, вследствие чего происходит изменение транспирации и потеря большого количества воды. У ряда видов в условиях *in vitro* не происходит образования корневых волосков, что приводит, в свою очередь, к нарушению абсорбции воды и минеральных солей из почвы. С другой стороны имеет место развитие внутритканевой латентной инфекции, а также поражение растения почвенной патогенной микрофлорой [1].

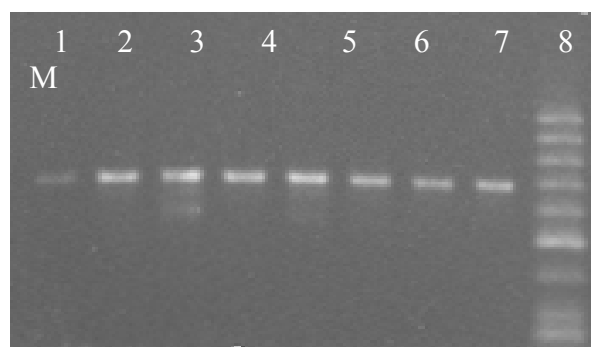
На основании вышеизложенного, целью работы являлась молекулярно-фитопатологическая диагностика микрофлоры клонов березы, осины и ясеня на этапах собственно микроразмножения и укоренения *in vitro*, и адаптации и доращивания *ex vitro*.

Исследовались растения *in vitro* следующих линий: береза – бп4а, бп3f1, бб31; осина – 47-1, Pt, Ptv22; ясень – Я 2.25, Я 2.37. В качестве контрольной группы были использованы соответствующие линии березы, осины и ясеня (1-5 лет) из лесных питомников и естественных насаждений.

На основании сравнительного анализа используемых диагностических локусов фитопатогенов был отобран набор ДНК-маркеров, позволяющий выявлять инфекцию в посадочном материале *in vitro* и *in vivo* лесных древесных видов. Для ПЦР диагностики патогенных грибов: фрагмент рДНК, содержащий внутренние транскрибируемые спейсеры 1, 2 (VTC1 и VTC2) и ген 5,8S рРНК – rDNA; фрагмент гена, детерминирующего белковую молекулу α -субъединицы фактора элонгации 1 – eEF-1 α ; фрагмент гена, детерминирующего белок β -тубулин – β -TUB.

Использование рДНК-маркера выявило некоторые особенности при диагностике заболеваний в посадочном материале покрытосеменных видов, в частности березы, осины, ясеня. ДНК-спектры посадочного материала лиственных пород (береза, осина, ясень), кроме генетического материала патогена в случае инфицированных растений, содержали и ампликоны растения-хозяина, что связано с гомологией нуклеотидных последовательностей в местах отжига праймеров ITS1 и ITS4 (регионы генов 18S и 28S рРНК) грибов и семенных растений.

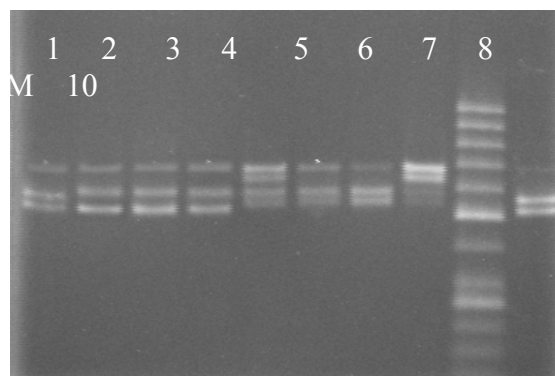
Электрофоретическое фракционирование показало, что микроклоны березы, осины и ясеня на этапе микроразмножения и укоренения *in vitro* характеризовались наличием только одной окрашенной зоны, специфичной для исследуемой породы. Данная диагностическая особенность *Angiospermae* использовалась в качестве дополнительного внутреннего контроля протекания ПЦР-реакции (рисунок 1).



1-2, 4-8 – незараженные растения, 3 – слабо инфицированное растение,
M – электрофоретический стандарт

Рисунок 1 – Фрагмент ПЦР-спектра незараженных и слабо инфицированных растений березы (праймеры ITS1 и ITS4)

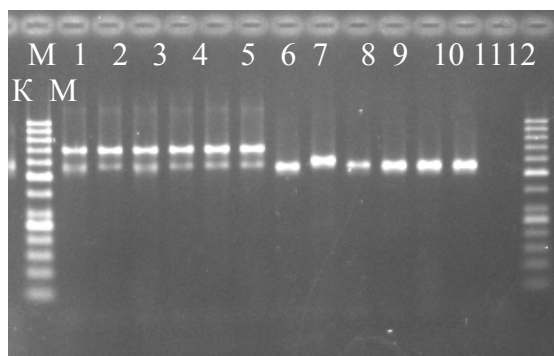
Исследование растений на этапе адаптации и доращивания в питомнике, а также образцов из естественных насаждений, позволило выявить многофракционные ПЦР-спектры, что свидетельствовало о содержании генетического материала микромицетов. В зараженных тканях, наряду с растительной ДНК и преобладающими вариантами ампликонов грибов, отмечалось дополнительное присутствие нескольких минорных фракций, что указывало на наличие в данных пробах одновременно доминирующих, и нескольких сопутствующих, представленных в следовых количествах, видов (рисунок 2).



*М – электрофоретический стандарт,
1-8, 10 – полиинфекция в тканях березы*

Рисунок 2 – Фрагмент ПЦР-спектра инфицированных растений березы из питомника (праймеры ITS1 и ITS4)

Для исследуемых образцов зараженных растительных тканей характеризующихся моноинфекционным поражением в результате оптимизации условий амплификации был получен однофракционный спектр, представленный генетическим материалом грибов (рисунок 3). При этом полученные ампликоны, отличались по размеру, что свидетельствовало о наличии в образцах различных видов грибов.



*М – электрофоретический стандарт,
1-6 – моноинфекция с наличием ДНК ясеня,
7-12 – моноинфекция с элиминацией ДНК ясеня,
К – отрицательный контроль*

Рисунок 3 – Фрагмент ПЦР-спектра инфицированных растений ясеня (праймеры ITS1 и ITS4)

В случае поливидовой инфекции тканей после этапа элиминации растительной ДНК, ампликоны грибов разделялись путем электрофоретического фракционирования в 2% агарозном геле и извлекались для дальнейшего секвенирования.

С целью выявления бактериальной инфекции была проведена реакция амплификации гена 16S рРНК бактерий с праймерами UNI IL/ UNI IR. При этом в образцах микроклонов *in vitro* получен однофракционный спектр с зоной амплификации растительной ДНК. Амплификация данного региона у соответствующих клонов *ex vitro* позволила выявить альтернативные электрофоретические варианты в диапазоне от 700-800 п.о., что указывало на наличие бактериальной инфекции во всех исследуемых образцах и согласовалось с литературными данными по диагностике бактерий с использованием праймеров данной структуры. Выявление видоспецифического полиморфизма по размеру амплифицируемых локусов было установлено также и при использовании праймеров, фланкирующих ген 23S РНК, а также фрагментов 16S-23S межгенного спейсера (праймеры 1406F и 23Sr, ITSF и ITSFRaub).

Все альтернативные варианты ампликонов были отобраны для проведения секвенирующей реакции. В исследованном растительном материале на стадии дорастивания в питомнике и образцах из естественных насаждений идентифицировалась фитопатогенная микрофлора.

По результатам секвенирования альтернативных вариантов ампликонов грибной ДНК, в растительном материале *ex vitro* идентифицировано 24 вида фитопатогенных и условно-патогенных грибов следующих родов: *Cladosporium*, *Alternaria*, *Phoma*, *Linospora*, *Melampsora*, *Microsphaera*, *Melanconium*, *Gloeosporium*, *Phomopsis* и *Peyronella*.

Анализ полученных нуклеотидных последовательностей бактерий, поражающих березу, осину и ясень, определил их принадлежность к 15 различным видам. Последующая идентификация в базе данных Генного банка NCBI позволила установить следующий перечень родов: *Burkholderia*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Leifsonia*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Xanthomonas* и *Xylella*.

В результате проведенного исследования установлено, что способ клонального микроразмножения лесных древесных растений, в частности березы, осины и ясеня, позволяет получать посадочный материал, свободный от инфекционной микрофлоры (с учетом латентной инфекции). Заболевание растений происходит по причине их заражения в условиях *ex vitro* за счет влияния неблагоприятных абиотических и биотических факторов.

Список литературы:

Генетические основы селекции растений. В 4 т. Т. 3. Биотехнология в селекции растений. Клеточная инженерия / науч. ред. А. В. Кильчевский, Л. В. Хотылева. – Минск: Беларус. навука, 2012. – 489 с.

