

# Молекулярно-генетическая идентификация фитопатогенов некоторых цветочных растений в насаждениях Беларуси

Рубель И. Э.<sup>1</sup>, Пантелеев С. В.<sup>1</sup>,  
Головченко Л. А.<sup>2</sup>, Дишук Н. Г.<sup>2</sup>, Константинов А. В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ГНУ «Институт леса НАН Беларуси», г. Гомель, Беларусь, [illiarubel@yahoo.com](mailto:illiarubel@yahoo.com)

<sup>2</sup> Центральный ботанический сад НАН Беларуси, г. Минск, Беларусь,  
[L. Golovchenko@cbg.org.by](mailto:L.Golovchenko@cbg.org.by)

**Резюме.** В статье описана диагностика болезней цветочных растений на основании использования классических фитопатологических методов и ДНК-анализа. Идентифицирован видовой состав возбудителей болезней 4 родов цветочных растений, используемых при озеленении в городских насаждениях. Установлено, что исследованная группа растений поражена болезнями грибной этиологии. Идентифицировано 12 видов фитопатогенных микромицетов родов *Alternaria*, *Aureobasidium*, *Botrytis*, *Cadophora*, *Cladosporium*, *Cryptococcus*, *Penicillium*, *Sclerotinia*, включая 4 новых, определенных впервые. Бактериальной инфекции не выявлено.

**Molecular genetic identification of the phytopathogens of some flowering plants in the plantations of Belarus.** Rubel I. E., Panteleev S. V., Golovchenko L. A., Dishuk N. G., Konstantinov A. V. **Summary.** The article describes the diagnosis of diseases of flowering plants based on the use of traditional and DNA analysis methods. The species composition of pathogens of 4 genera of flowering plants used in planting in urban plantations was identified. It is established that the investigated group of plants is affected by diseases of fungal etiology. 12 species of phytopathogenic micromycetes of the genera *Alternaria*, *Aureobasidium*, *Botrytis*, *Cadophora*, *Cladosporium*, *Cryptococcus*, *Penicillium*, *Sclerotinia* were identified, including 6 new ones, determined for the first time. Bacterial infection was not detected.

В Беларуси цветочному оформлению отводится большая роль в городском озеленении. Сохранность, долговечность, декоративные качества цветников во многом зависят от правильно проводимых мероприятий по уходу за растениями, среди которых важное место занимает защита растений от болезней и вредителей. Помимо аборигенной микрофлоры, в процессе интродукции вместе с посадочным материалом в страну попадают чужеродные, потенциально инвазивные возбудители заболеваний. Массовое размножение чужеродных видов в совокупности с болезнетворной аборигенной микрофлорой могут привести к существенному ущербу для местных и интродуцированных видов растений [1].

Идентификация видов, трудно диагностируемых классическими методами, некультивируемых патогенов, инвазивных инфекционных агентов требует разработки специальных подходов к их идентификации, основанных на применении молекулярно-генетических методов анализа. Методы ДНК-анализа позволяют достоверно идентифицировать возбудителя при наличии всего лишь одной либо нескольких клеток патогена в растении, т. е. на стадии еще бессимптомного течения заболевания, различать виды-двойники и устанавливать степень их патогенности [2].

Несмотря на достаточно большое количество изученных видов фитопатогенов цветочных растений, а также их экологическую и хозяйственную значимость, данные по их анализу раз-

рознены и неполны. Что касается Беларуси, то исследования по молекулярно-генетической диагностике возбудителей инфекционных заболеваний цветочных растений ранее не проводились.

Материалом для исследования служили луковичные (тюльпан, гиацинт) и корневищные (ирис, пион) цветочные растения с симптомами поражения болезнями. Экспериментальный материал был собран на урбанизированных территориях, а также в коллекционных фондах растений Центрального ботанического сада НАН Беларуси. Идентификацию возбудителей болезней растений классическими методами фитопатологии проводили в лаборатории защиты растений Центрального ботанического сада НАН Беларуси. Образцы цветочных растений для проведения молекулярно-генетической идентификации патогенов были переданы в лабораторию генетики и биотехнологии Института леса НАН Беларуси. Выделение суммарной ДНК из растительных тканей вегетативных и репродуктивных органов проводилось с использованием модифицированного СТАВ-метода [2]. Для идентификации в исследуемых образцах грибной микрофлоры был выбран маркерный регион рДНК 18S-ITS1–5,8S-ITS2–28S. Для диагностики бактериальной инфекции был выбран фрагмент гена 16S рРНК (2 домен). В ходе полимеразной цепной реакции (ПЦР) использовался набор универсальных праймеров для идентификации грибной (ITS1, ITS1F, ITS2, ITS3, ITS4) и бактериальной микрофлоры (UNI) [3–5]. Секвенирование ПЦР-продуктов проводилось в генетическом анализаторе Abi Prism 310 (Thermo Fisher Scientific) в соответствии с прилагаемой инструкцией. Анализ полученных результатов проводился в базе данных генного банка Национального центра биотехнологической информации (NCBI, США) [6].

На этапе ПЦР проведена оптимизация амплификации видоспецифических локусов фитопатогенных грибов. В случае использования праймеров ITS1/ITS4, ITS1/ITS2, ITS3/ITS4 кроме генетического материала патогена, в случае инфицированных растений, в образцах содержались ампликоны растения-хозяина, что связано с гомологией нуклеотидных последовательностей грибов и покрытосеменных растений в местах отжига праймеров (регионы генов 18S и 28S рРНК) (рис. 1).

Однако для проведения идентификации видов методом секвенирования необходима элиминация ампликонов растения-хозяина, что было достигнуто при использовании праймеров ITS1F/ITS4 (низкая степень гомологии нуклеотидных последовательностей в месте отжига праймера ITS1F в регионе гена 18S рРНК). Таким образом, данная комбинация праймеров использовалась в дальнейших исследованиях.

В ходе ПЦР был выявлен спектр фракций грибной ДНК различной длины ( $\approx 550$ –790 пар нуклеотидов) и интенсивности, что свидетельствовало о наличии в исследуемых образцах полиинфекции доминирующих и сопутствующих видов (рис. 2).

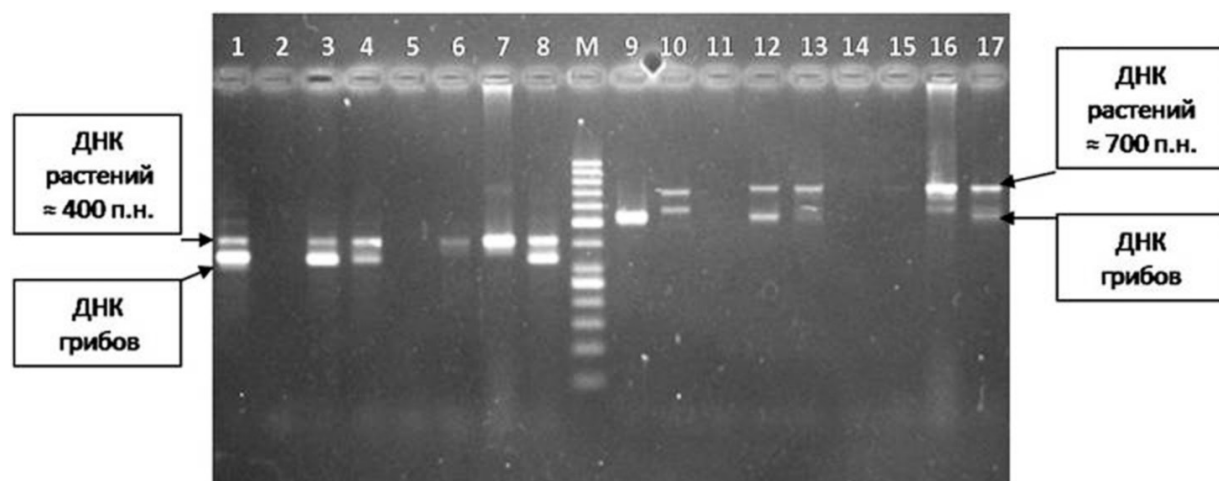
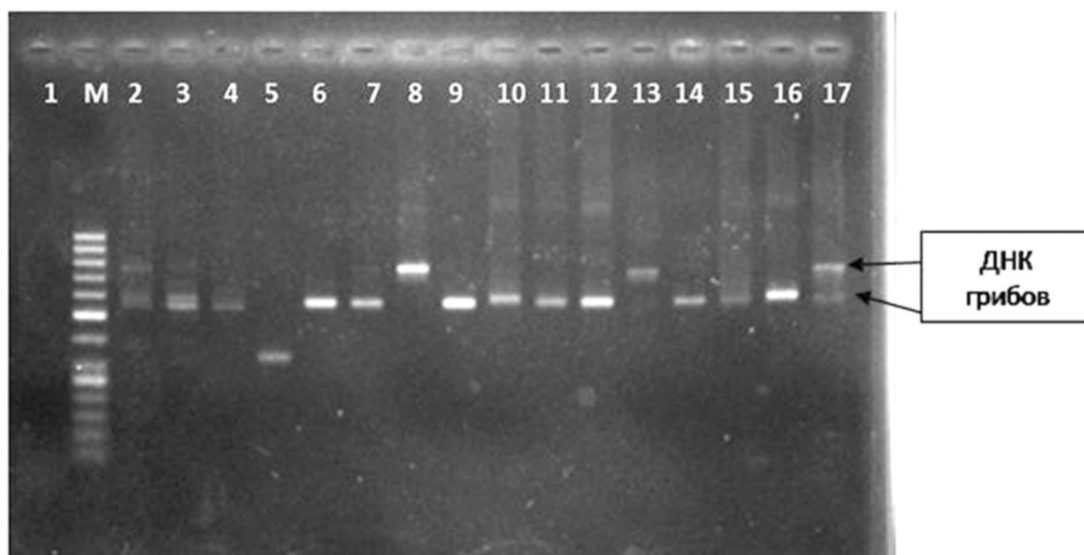


Рис. 1. Фрагмент ПЦР-спектра грибной микрофлоры и растений-хозяев: 1–8 — ПЦР-продукты ITS3/ITS4; 9–17 — ПЦР-продукты ITS1/ITS4; М — электрофоретический стандарт



**Рис. 2.** Фрагмент ПЦР-спектра грибной микрофлоры цветочных растений: 1 — отрицательный контроль (вода); 2–17 — ПЦР-продукты ITS1F/ITS4; М — электрофоретический стандарт

По результатам идентификации видового состава патогенов растений с использованием классических методов видовой диагностики на луковичных цветочных растениях выявлены 3 вида патогенных грибов; на корневищных цветочных растениях — 5 видов патогенных грибов (табл. 1).

Проведение молекулярно-генетического анализа позволило выявить большее разнообразие грибов в тех же образцах цветочных растений: идентифицированы как патогенные, так и условно патогенные виды. По результатам секвенирования выявленных ампликонов грибов в базе данных генного банка Национального центра биотехнологической информации (NCBI, США) идентифицировано 12 видов грибов.

Как видно из табл. 1, треть исследованных образцов поражены грибами с таксономическим статусом «sp. nov», что свидетельствует о том, что данные виды диагностированы впервые и в настоящий момент не имеют морфологической характеристики.

Вид *Botrytis* sp. nov, идентифицированный на пионах, является родственным видом *B. raenoniae* Oudem. — фитопатогена пионов и *B. elliptica* (Berk.) E. Wright — возбудителя пятнистости листьев цветочных растений семейства Лилейных. Генетическое сходство данных видов по исследованному локусу рДНК (ITS) составляет 98%.

Вид *Cryptococcus* sp. nov, выявленный в стеблях пионов, имеет генетическое сходство с неизвестными и до настоящего времени некультивируемыми видами рода *Cryptococcus*, идентифицированными зарубежными авторами на широком спектре растений с использованием молекулярно-генетического анализа.

В стеблях тюльпана с симптомами пенициллеза, определен новый вид пеницилла (*Penicillium* sp. nov), генетически сходного на 99% со штаммом *Penicillium* sp.3 (ID AJ004820), идентифицированным в образцах почвы датским ученым П. Скубо с сотрудниками в 1999 г. Ближайшим описанным родственным видом является цветочный патоген *P. gladioli* McCulloch (98%).

Вид *Cladosporium* sp. nov, идентифицированный в некротических бурых пятнах на листьях ириса, является близкородственным патогеном *C. herbarum* (Pers.) Link и *C. cladosporioides* (Fresen.) G.A. de Vries (99% генетического сходства по маркерному локусу рДНК).

Следует отметить, что возбудителем гнили лукович гиацинта явился гриб *Cadophora malorum* (Kidd & Beaumont) W. Gams — известный в литературе как возбудитель боковой гнили яблони и груши. Однако в зарубежной литературе в последние годы данный вид ассоциируется также с гнилью гиацинта [7].

В ходе ПЦР-анализа бактериальной микрофлоры фитопатогенных видов не выявлено.

Таблица 1

Фитопатогенные грибы, идентифицированные  
в исследованных образцах цветочных растений

| Род растений | Вид фитопатогена/ локализация   |   |
|--------------|---|---|
|              | по результатам молекулярно-генетического анализа                                    | по результатам классических методов фитопатологии                   |
| Пион         | <i>Botrytis cinerea</i> Pers. / стебель   | <i>Botrytis cinerea</i> Pers. / стебель, листья, цветок             |
|              | <i>Botrytis</i> sp. nov / стебель   | <i>Botrytis paeoniae</i> Oudem. / стебель, листья                   |
|              | <i>Cryptococcus</i> sp. nov / стебель   |   |
|              | <i>Aureobasidium pullulans</i> (de Bary & Lowenthal) G. Arnaud / листья, прицветник |   |
|              | <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> (Lib.) de Bary / листья, стебель                    |   |
| Ирис         | <i>Alternaria alternata</i> (Fr.) Keissl. / листья                                  | <i>Alternaria alternata</i> (Fr.) Keissl. / листья                  |
|              | <i>Botrytis cinerea</i> Pers. / листья  | <i>Botrytis cinerea</i> Pers. / листья                              |
|              | <i>Cladosporium iridis</i> (Fautrey & Roum.) G.A. de Vries / листья, корневище      | <i>Cladosporium iridis</i> (Fautrey & Roum.) G.A. de Vries / листья |
|              | <i>Cladosporium</i> sp. nov / листья  | <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> (Lib.) de Bary / корневище          |
|              | <i>Uncultured Wilcoxina</i> (некультивируемый вид) / корневище                      |   |
| Тюльпан      | <i>Alternaria infectoria</i> Simmons / лист   | <i>Botrytis tulipae</i> (Lib.) Lind                                 |
|              | <i>Botrytis cinerea</i> Pers. / листья  | <i>Botrytis cinerea</i> Pers. / лист                                |
|              | <i>Penicillium</i> sp. nov / стебель  | <i>Penicillium</i> sp. / стебель                                    |
| Гиацинт      | <i>Cadophora malorum</i> (Kidd & Beaumont) W. Gams / луковица                       |   |

Таким образом, в результате диагностики фитопатогенной микрофлоры некоторых луковичных (тюльпан, гиацинт) и корневищных (ирис, пион) цветочных растений традиционными фитопатологическими методами идентифицировано 8 видов фитопатогенных грибов. Молекулярно-генетическая диагностика позволила идентифицировать 12 видов фитопатогенных грибов, включая 4 новых, определенных впервые. Следует отметить, что в большинстве случаев данные микологического и генетического анализа согласуются, что свидетельствует о точности и достоверности проведенной диагностики.

## Список литературы

1. Lowry E., Rollinson E. J., Laybourn A. J., Scott T. E., Aiello-Lammens M. E., Gray S. M., Mickley J., Gurevitch J. Biological invasions: A field synopsis, systematic review, and database of the literature. Ecology and evolution, 2012, V. 3, P. 182–196.
2. Падутов В. Е., Баранов О. Ю., Воропаев Е. В. Методы молекулярно-генетического анализа. Мн.: Юнипол, 2007, 176 с.
3. White T. J., Bruns T. D., Lee S. B., Taylor J. W. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Academic Press, 1990, P. 315–322.

4. Gardes M., Bruns T. D. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes application of the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology*, 1993, V. 2, P. 113–118.
5. Sauer P., Gallo J., Kesselova M., Kolar M., Koukalova D. Universal primers for detection of common bacterial pathogens causing prosthetic joint infection. *Biomed Pap Med*, 2005, V. 149, № 2, P. 285–288.
6. National Center for Biotechnological Information, NCBI [Electronic resource]. Mode of access: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. — Date of access: 14.09.2016.
7. Dagno K., Lahlali R., Diourte M., Jijakli M. H. Production and oil-emulsion formulation of *Cadophora malorum* and *Alternaria jacinthicola*, two biocontrol agents against water hyacinth (*Eichhornia crassipes*). *Afr. J. Microbiol. Res.*, 2011, V. 5, P. 924–929.