Е. В. Васеха, снс, к. с.-х. н.,
В. С. Комардина, зав. лаб защиты плодовых культур, к. б. н.,
О. В. Дичковская, мнс
РУП «Институт защиты растений», аг. Прилуки, Республика Беларусь
belizr@tut.by

УДК 634.11:632.4(476)

DOI 10.31676/2073-4948-2019-56-118-123

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕТОДЫ В ДИАГНОСТИКЕ ФИТОПАТОГЕНОВ ЯБЛОНИ В БЕЛАРУСИ

Резюме. В статье представлены результаты исследований по молекулярно-генетической идентификации патогенов, вызывающих монилиоз, антракноз яблони, и карантинной болезни – монилиального ожога плодовых культур. Приведены данные молекулярного анализа изолятов рДНК гриба *Venturia inaequalis* – возбудителя парши яблони, выявлена генетическая неоднородность популяций патогена.

Ключевые слова: молекулярные методы, диагностика, фитопатогены, раса, яблоня.

Summary. In the article the results of molecular-genetic identification of the pathogens causing brown rot, anthracnose and quarantine disease – fire blight are presented. Molecular analysis data of rDNA *Venturia inaequalis* isolates – causative agent of apple scab are presented. Genetic heterogeneity of pathogen populations has been revealed.

Keywords: molecular methods, diagnostics, phytopathogens, race, apple tree.

Введение

Яблоня является основной плодовой культурой, занимающей 95% площади садов в Республике Беларусь. В рамках государственной программы по развитию плодового хозяйства в период с 2004 года посадки культуры увеличились до 97,1 тыс. га, из которых 16,3 составляют насаждения интенсивного типа. В связи с расширением площадей семечковых культур потребовался ввоз посадочного материала из-за рубежа. Широкое возделывание интродуцированных сортов, не адаптированных к почвенно-климатическим условиям республики, а также несоблюдение технологии их выращивания привело к изменениям фитосанитарной ситуации в яблоневых садах. Наряду с традиционными для садов болезнями, такими как парша и мучнистая роса, возрастает пораженность яблони болезнями, ранее не имевшими экономического значения: антракнозом, раковыми болезнями; отмечено появление новой формы монилиоза, поражающего побеги и плодовые образования. В последние годы возросла вредоносность парши яблони – отмечено поражение сортов как с моногенной (ген *Rvi6*), так и полигенной устойчивостью. В 2007 году в республике зарегистрировано карантинное заболевание – бактериальный ожог плодовых культур (возбудитель болезни – бактерия *Erwinia amylovora* Winslonetal.).

Для выбора правильной тактики защиты насаждений яблони от фитопатогенных микроорганизмов необходима оперативная диагностика их видоспецифичности, расового состава, патогенности. Традиционные методы диагностики, основанные на визуальной оценке болезней по симптоматике и определении микроорганизмов по культурально-морфологическим признакам, являются трудоемкими и не всегда позволяют с высокой долей вероятности идентифицировать возбудителя болезни. Молекулярно-генетические методы способны обеспечить высокую универсальность, относительную простоту и высокое качество идентификации патогенов и используются для решения фундаментальных и прикладных проблем микологии, генетики и фитопатологии. Для практической диагностики грибов широко используют метод ПЦР и ПЦР в реальном времени с видоспецифичными праймерами на консервативные участки генома [1].

Целью нашей работы было уточнение видового состава и генетической структуры популяций фитопатогенов в насаждениях яблони с применением молекулярных методов.

Материалы и методы

Исследования проводились в 2010-2016 гг. в РУП «Институт защиты растений» совместно с сотрудниками Белорусского государственного университета и ГНУ «Институт леса НАН Беларуси». Материал для исследований был собран с пораженных растений яблони, характеризующихся соответствующей симптоматикой, в ходе маршрутных обследований садов в различных регионах республики. В чистую культуру были выделены грибы *Venturia inaequalis* (Coock.) Wint., *Monilinia* spp., *Neofabraea* spp., которые культивировали на яблочном и картофельно-декстрозном агаре при температуре 19-25 °С, и штаммы бактерий *E. amylovora*, культивируемые на LB-среде при 28 °С.

Экстракцию ДНК грибов проводили стандартными методами с использованием коммерческого набора Genomic DNA Purification Kit (Fermantas, Литва). Подбор видоспецифичных праймеров и амплификацию нужных фрагментов ДНК грибов *V. inaequalis*, *Monilinia* spp., реакции рестрикции с ферментами *CfoI*, *Sall* и *BstUI* осуществляли в соответствии с протоколами, описанными в работах авторов Côté M.-J., Hughes K.J.D., Gariépy T.D., Shnabel G. [2-5]. ПЦР с использованием праймеров Eam1и и Eam2 и рестрикция ферментами *AvaI*, *EcoRV*, *PvuII* для идентификации *Erwinia amylovora* были выполнены с использованием стандартных молекулярных протоколов [6, 7]. Продукты ПЦР и рестрикции анализировали электрофоретически с использованием 1,8% агарозы в ТАЕ-буфере. Гели, окрашенные бромистым этидием, визуализировали в трансиллюминаторе (Vilber Lourmat, Франция) с программным обеспечением Vision-Capt. Последующее секвенирование

ПЦР-продуктов осуществляли в ГНУ «Институт леса НАН Беларуси» и Makrogen Europe (Нидерланды). Нуклеотидную структуру секвенированных ампликонов грибов анализировали с помощью программы BLAST в открытой базе генетических данных GenBank.

Результаты исследований

В семечковых садах Беларуси парша является одной из наиболее экономически значимых болезней яблони, потери урожая от которой могут достигать 60%, при этом выход первосортной продукции на восприимчивых сортах снижается до 90%. Знание расового состава популяции и динамики ее изменения позволяет прогнозировать развитие болезни и продолжительность сохранения устойчивости сортов.

В 2008-2015 гг. нами совместно с сотрудниками БГУ проводились исследования по изучению генетического разнообразия в популяциях возбудителя болезни – гриба *V. inaequalis*, в которых было проанализировано 50 изолятов гриба, выделенных из сортов яблони иностранной и отечественной селекции, из разных регионов республики. Проведенный анализ области рДНК 18S-ITS1-5,8S показал, что структура белорусской популяции *V. inaequalis* неоднородна и состоит из 2 групп, различающихся по размеру исследуемого участка рДНК и частоте встречаемости их представителей. Из проанализированных изолятов 90% имели размер ампликона 270 п. н., в то время как 10% характеризовались длиной анализируемого участка 660 п. н., что обусловлено наличием интрона в гене 18S рРНК. При этом доминирующие изоляты гриба *V. inaequalis* интрон⁻ были выделены из сортов интродуцированных и отечественных сортов *Malus domestica* в основном из садов промышленного типа. Интрон⁺ изоляты были идентифицированы из сортов яблони домашней сортов Антоновка обыкновенная и Айдаред и 3 образцов вида *Malus sieversii f. niedzwetzkyana*.

Выявленная частота встречаемости представителей двух групп отличает белорусскую популяцию от ряда европейских, в которых частота встречаемости интрон⁺ штаммов выше по сравнению со штаммами, характеризующимися отсутствием интрона [8].

В дальнейшей работе белорусские изоляты были подвергнуты анализу полиморфизма рестрикционных фрагментов ранее амплифицированных участков рДНК с использованием рестриктаз *Bst*UI, *Cfo*I и *Sal*I, в результате чего было получено до 3 рестриктов разного размера. Сравнительный анализ полученных данных показал, что набор образовавшихся фрагментов рестрикции аналогичен таковому для изолятов *V. inaequalis*, выделенных из садов США и ряда европейских стран. Из проанализированных сайтов для трех рестриктаз только область распознавания ферментом *Sal*I являлась вариабельной, в результате чего согласно классификации Schnabel G. было

определено наличие I и II интронных аллелей у белорусских изолятов. По данным автора при изучении пяти различных рас возбудителя парши яблони было установлено, что раса 1 относится к IV интронному аллелю, расы 2, 4 и 5 – ко II аллелю и раса 3 – к I аллелю [5].

Наши исследования показали, что среди проанализированных изолятов белорусской популяции большинство (90%) имеют I аллель интрона и соответственно принадлежат к 3-й расе. В то же время 10% исследуемых образцов имели в составе рДНК II интронный аллель, что позволяет их отнести к расам 2, 4 и 5, вызывающих поражение сортов яблони с генами устойчивости *Rvi2*, *Rvi4*, *Rvi5*.

Монилиоз также является широко распространенной и вредоносной болезнью яблони, потери урожая от которой могут достигать 60%. Возбудители болезни – грибы из рода *Monilinia* вызывают плодовую гниль, усыхание побегов, соцветий и ветвей яблони [2]. До 2012 г. на территории нашей республики в семечковых садах был идентифицирован гриб *M. fructigena*. В связи с появлением в странах Европы нового вида *M. polystroma*, а также распространением карантинного вида *M. fructicola*, возникла необходимость уточнения видового состава возбудителей монилиоза яблони в садах Беларуси и оценки современных методов их идентификации.

В течение 2010-2012 гг. нами были проанализированы 65 изолятов грибов рода *Monilinia*, выделенных из пораженных монилиозом плодов, соцветий, побегов, плодовых образований яблони. В результате проведения ПЦР с видоспецифичными праймерами, а также на основании результатов секвенирования ITS 1-5.8S рРНК- ITS 2 локуса рибосомальной ДНК, в популяции грибов рода *Monilinia* идентифицировано 2 вида: *M. fructigena* и *M. laxa*, при этом гриб *M. laxa* был впервые выявлен на яблоне на территории республики. Анализ полученных данных показал, что в общей структуре видов с частотой встречаемости 91,6-100% доминирует гриб *M. fructigena*, вызывающий поражение соцветий, побегов (монилиальный ожог) и плодов (плодовая гниль). Встречаемость гриба *M. laxa* на пораженных плодах и завязях яблони составила 8,4%, на плодовых образованиях – 5,4%. Во время проведения исследований карантинный вид *M. fructicola* в садах республики не был выявлен.

В последние годы в насаждениях яблони отмечается увеличение распространенности антракноза. По данным зарубежных авторов, возбудителями болезни являются 4 вида грибов из рода *Neofabraea*, которые различаются по агрессивности и патогенности. В европейских странах доминирующим видом является гриб *Neofabraea alba* [9]. В садах Беларуси возбудители болезни вызывают поражение коры и древесины на штамбах, скелетных ветвях деревьев и молодых побегах, что приводит к образованию язв, которые окольцовывают побеги. При сильном повреждении и

распространенности до 90% наблюдается гибель молодых деревьев. Язвы также являются источником заражения плодов, на которых при хранении развивается гниль по типу «бычий глаз».

В связи с этим нами были проведены исследования по уточнению видового состава возбудителей болезни. При проведении молекулярной идентификации грибов были проанализированы изоляты, выделенные из пораженных антракнозом плодов и однолетних побегов яблони. В ходе сопоставления результатов секвенирования ITS 1-5.8S рНК- ITS 2 региона анализируемых образцов было выявлено их 99%-ное сходство с депонированными образцами гриба *Neofabraea alba* (CBS 452.64, MM 159, UASWS 0519 и др.). Полученные результаты позволяют сделать вывод, что гриб *N. alba* вызывает не только поражение плодов яблони, но также может инфицировать однолетние побеги. Идентификация штаммов *Neofabraea* spp., выделенных из пораженных штамбов яблони, продолжается.

Для идентификации изолятов *E. amylovora* ПЦР проводили с праймерами Eam1 и Eam2, специфичными к гену hrpN. Этот метод молекулярной диагностики для выявления и идентификации возбудителя бактериального ожога плодовых культур разработан сотрудниками кафедры молекулярной биологии БГУ (Lagonenko A.L. et al., 2011) и основан на амплификации фрагмента хромосомного гена hrpN размером 1200 п. н. [7]. Специфичные праймеры к гену харпина амплифицировали ДНК из 10 штаммов *E. amylovora*. Чувствительность диагностической процедуры составляет 10 клеток *E. amylovora* на реакцию ПЦР. Кроме того, при первичной диагностике использовался также и рестрикционный анализ продуктов ПЦР с рестриктазами EcoRV, PvuII и AvaI, каждая из которых имеет 1-2 сайта рестрикции с геном hrpN бактерии *E. amylovora*, который также подтвердил видовую идентификацию [6, 7].

Выводы

1. Изучение генетического разнообразия гриба *V. inaequalis* – возбудителя парши яблони позволило выявить I и II интронные аллели, на основании которых в белорусской популяции идентифицирована раса 3 и с высокой долей вероятности – расы 2, 4 и 5.

2. Проведенные исследования показали возможность проведения видовой идентификации грибов рода *Monilinia* spp. – возбудителей монилиоза яблони методом ПЦР и на основании секвенирования локусов рДНК, что позволило идентифицировать 2 вида – *M. fructigena* и *M. laxa*.

3. В комплексе видов *Neofabraea* spp. методом секвенирования идентифицирован гриб *N. alba*, вызывающий антракноз на однолетних побегах и гниль плодов яблони.

4. Методом молекулярной диагностики, основанном на амплификации фрагмента хромосомного гена hrpN, проводится выявление и идентификация

карантинного объекта – возбудителя бактериального ожога плодовых культур.

Список использованной литературы

1. Высокопроизводительные и высокоточные технологии и методы фитосанитарного мониторинга / Под ред. И. В. Гричанова. – СПб: ВИЗР, 2009. – 84 с.
2. Schnabel G., Schnabel E. L., Jones A. L. Characterization of ribosomal DNA from *Venturia inaequalis* and its phylogenetic relationship to rDNA from other tree-fruit *Venturia* species // Phytopathology, 1999. – Vol. 89, № 1. – P. 100-108.
3. Кулик Е. В., Комардина В. С., Саросек А. И., Евтушенков А. Н. Молекулярная дифференциация изолятов *Venturia inaequalis* // Весці Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі, 2013. – № 3. – С. 36-40.
4. Côté M.-J., Tardif M.-C., Meldrum A. J. Identification of *Monilinia fructigena*, *M. fructicola*, *M. laxa*, and *Monilia polystroma* on Inoculated and Naturally Infected Fruit Using Multiplex PCR // Plant Disease, 2004. – Vol. 88, № 11. – P. 1219-1225.
5. Hughes K. J. D., Fulton C. E., McReynolds D., Lane C. R. Development of new PCR primers for identification of *Monilinia* species // Bulletin OEPP/EPPO Bulletin, 2000. – № 30. – P. 507-511.
6. Gariépy T. D., Lévesque C. A., Jong S. N., Rahe J. E. Species specific identification of the *Neofabraea* pathogen complex associated with pome fruits using PCR and multiplex DNA amplification // Mycol. Res., 2003. – Vol. 107, № 5. – P. 528-536.
7. Pešicová K., Kolařík M., Hortová B., Novotný D. Diversity and identification of *Neofabraea* species causing bull's eye rot in Czech Republic // Eur. J. Plant Pathol., 2017. – Vol. 147. – P. 683-693.
8. Lagonenko A. L., Komardina V. S., Nikolaichik Y. A., Evtushenkov A. N. First report of *Erwinia amylovora* fire blight in Belarus // J. Phytopathology, 2008. – Vol. 156. – P. 638-640.
9. Lagonenko A. L., Lagonenko V. Y., Nikolaichik Y. A., Evtushenkov A. N. Detection of *Erwinia amylovora* by PCR with primers to the hrpN gene // Acta Hort., 2011. – Vol. 896. – P. 85-91 (Abstract).

E. V. Vasekha, V. S. Komardina, O. V. Dichkovskaya

Institute of Plant Protection, Pryluki, Belarus

MOLECULAR METHODS IN THE DIAGNOSTICS OF APPLE TREE PATHOGENS IN BELARUS