

ВИДОВАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ *HETEROBASIDION ANNOSUM* (FR.) BREF. В ОЧАГАХ УСЫХАНИЯ СОСНЫ ОБЫКНОВЕННОЙ НА ТЕРРИТОРИИ НАЦИОНАЛЬНОГО ПАРКА «ШУШЕНСКИЙ БОР», М.А. Шеллер^{1*}, А.И. Татаринцев¹, Т.В. Сухих², А.А. Ибе², П.В. Михайлов¹

¹ Сибирский государственный университет науки и технологии имени академика М.Ф. Решетнева и

² Центр защиты леса Красноярского края, Красноярск, Россия

* Эл. почта: maralexsheller@mail.ru

Статья поступила в редакцию 30.03.2023; принята к печати 18.05.2023

Представлены результаты молекулярно-генетической идентификации корневого патогена в очагах усыхания древостоев сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) на территории национального парка «Шушенский бор» (Шушенский район Красноярского края). Образцы плодовых тел были отобраны с пораженных деревьев в шести кварталах Перовского лесничества, расположенного в пределах Минусинской котловины. Выявлено, что возбудителем корневой гнили в сосняках является макромицет *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref., относящийся к комплексу *H. annosum* s. l. (корневая губка). Полученные результаты молекулярно-генетического анализа могут быть использованы в лесопатологическом мониторинге лесов Сибири.

Ключевые слова: *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref., корневая гниль, Шушенский бор, молекулярно-генетический анализ, секвенирование.

IDENTIFICATION OF THE FUNGAL SPECIES *HETEROBASIDION ANNOSUM* (FR.) BREF. IN THE FOCI OF DRYING OF *PINUS SYLVESTRIS* PINES IN SHUSHENSKIY BOR NATIONAL PARK

M.A. Sheller^{1*}, A.I. Tatarintsev¹, T.V. Sukhikh², A.A. Ibe², P.V. Mikhaylov¹

¹ M.F. Reshetnev Siberian State University of Science and Technology

and ² Krasnoyarsk Regional Center of Forest Protection, Krasnoyarsk, Russia

* Email: maralexsheller@mail.ru

The molecular-genetic identification of the root pest found in the foci of drying of the pine *Pinus sylvestris* L. in the national park Shushenskiy Bor (Shushenskiy District of Krasnoyarsk Region, Russia) was carried out using samples collected from lesioned trees in six plots of Petrovskoye Forestry located in Minusinsk Depression. The causative agent of root rot was identified as the macromycete *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref., referred to the complex *H. annosum* s. l. (root sponge). The results are useful for forest pathology monitoring in Siberia.

Keywords: *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref., root sponge, Shushenskiy Bor, molecular genetic analysis, DNA sequencing.

Введение

Корневая губка (*Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref.) является одним из наиболее опасных фитопатогенных грибов, поражающих хвойные породы деревьев [1, 2, 8, 10]. Данный гриб вызывает пеструю ситовую гниль древесины корневой системы и комлевой части ствола. Патогенное воздействие корневой губки приводит к резкому ухудшению санитарного состояния насаждений и причиняет ущерб в виде снижения продуктивности древостоев, обесценивания древесины, дополнительных затрат на проведение санитарных рубок [2].

На территории России распространение и экология видов *Heterobasidion* изучались ограниченно, только в некоторых районах страны. Например, на Урале в смешанных насаждениях пихты сибирской и ели сибирской был идентифицирован фитопатогенный гриб *H. parviporum* [10]. На Алтае в насаждениях сосны обыкновенной был обнаружен *H. annosum* [3]. Позднее *H. annosum* был выявлен в сосновых борах Минусинской котловины (юг Красноярского края) в древостоях искусственного и естественного происхождения [3, 5]. Первоначально идентификация вида здесь была выполнена по морфологическим особенностям базиди-

ом, окончательно – с использованием метода скрещивания моноспоровых культур с гомокариотическими тестерами. В настоящее время этот район рассматривается как восточная граница распространения данного вида макромицета в Евразии.

В рамках продолжения изучения проблемы усыхания уникальных сосняков Минусинской котловины в 2022 году были проведены генетические исследования корневой губки по материалам, отобранным в сосняках Перовского лесничества Национального парка «Шушенский бор». Цель работы – уточнение видовой принадлежности возбудителя корневой гнили в древостоях сосны с помощью молекулярно-генетического анализа методом секвенирования ДНК.

Материалы и методы

В качестве материала для исследования послужили плодовые тела, обнаруженные на сосне обыкновенной (взрослые деревья с утраченной жизнеспособностью, погибший подрост) на территории Перовского лесничества в лесостепной части национального парка «Шушенский бор». Отбор образцов проводился из очагов усыхания в шести кварталах лесничества.

Первичная идентификация вида осуществлялась по морфологическим особенностям плодовых тел видов комплекса *H. annosum* [6, 8]. Для дальнейшей идентификации вида гриба был проведен молекулярно-генетический анализ образцов методом секвенирования ДНК. Метод основан на сочетании принципов полимеразной цепной реакции (ПЦР) с последующим секвенированием фрагментов. Проводимая на первом этапе ПЦР позволяет выявить полиморфизм в красных областях локуса (местах посадки праймеров) [4]. Далее проводится прямой анализ нуклеотидной последовательности с помощью секвенирования. Полученные при секвенировании нуклеотидные последовательности анализируемых образцов сравниваются с информацией по секвенированию данного региона рибосомальной ДНК в современных электронных генетических базах данных, открытых для прямого доступа.

Процедура молекулярно-генетической диагностики состояла из следующих стадий: выделение суммарной ДНК из анализируемого материала; амплификация локусов грибной ДНК методом ПЦР; расшифровка структуры амплифицированных локусов (секвенирование); сравнительный анализ в базе данных (идентификация). Выделение суммарной ДНК было выполнено СТАВ-методом [7]. ПЦР анализ был выполнен с применением готовой смеси «GenePak PCR Core» (ООО «Лаборатория Изоген») при следующих параметрах реакции: начальная денатурация – 4 мин при 96 °С, последующие 30 циклов – 1 мин при 96 °С, отжиг – 30 сек при 60 °С, элонгация – 2 мин при 72 °С, финальная элонгация – 10 мин при 72 °С, охлаждение –

5 мин при 4 °С. Для амплификации были использованы праймеры ITS1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG) и ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) [11]. Электрофоретическое разделение продуктов амплификации проводили в горизонтальных камерах «Helicon» в однократном ТВЕ-буфере (трис-боратный электродный буфер) в 2% агарозном геле. Электрофорез проводили при комнатной температуре в течение 1 ч при параметрах тока – 90 В/60 мА. Визуализация продуктов электрофореза достигалась окрашиванием гелевых пластин в растворе бромистого этидия (0,5 мкг/мл) в течение 10 мин. Затем гель извлекался и промывался в дистиллированной воде для удаления остатков красителя. Фотодокументирование продуктов электрофореза достигалось за счет видеосканирования в УФ-свете специальной системой Gel-Imager. Для дальнейшей видовой идентификации грибов производили иссечение фрагмента геля, содержащего ДНК-фрагмент гриба. Очистка фрагментов ДНК от геля проводилась набором реагентов «Био-Силика» в соответствии с протоколом производителя (ООО «БиоСилика»). Секвенирование фрагментов ДНК осуществляли с помощью генетического анализатора ABI PRISM 310 (Applied Biosystems) на основании использования набора BigDye Terminator Sequence Kit v. 1.1, согласно методике компании-изготовителя. Анализ нуклеотидных последовательностей образцов производился с помощью программ Sequencing Analysis v. 6. Нуклеотидная структура секвенированных ампликонов была проанализирована с помощью программы BLAST в GenBank NCBI (The National Center for Biotechnology Information).

Результаты и обсуждение

По данным молекулярно-генетической диагностики в Перовском лесничестве в лесостепной части национального парка «Шушенский бор» в образцах из плодовых тел в очагах усыхания сосны обыкновенной (рис. 1) идентифицирован фитопатогенный гриб *H. annosum*.

Идентификация всех выявленных изолятов по базе данных NCBI показала их ближайшее сходство с данным видом – на 98–99% (табл. 1).

Нарушение санитарного состояния сосняков в межгорных котловинах на юге Средней Сибири к настоящему времени проявляется в групповом и куртинном усыхании древостоев (рис. 2).

Признаки этой проблемы в сосняках Шушенского бора, расположенного в южной части Минусинской котловины, обнаруживались с середины 1980-х годов, первоначально в отдельных его частях в виде единичного, реже группового патологического отпада деревьев. Причина усыхания была не ясна вплоть до начала следующего десятилетия, когда на свежем сухостое начали обнаруживать плодовые тела предположительно корневой губки, что позволило гово-



А

Б

В

Рис. 1. Плодовые тела (базидиомы) *H. apposum*: А – в основании ствола усохшего дерева; Б, В – на стволике (корневая шейка) погибшего подроста

Табл. 1

Результаты молекулярно-генетической идентификации *H. apposum* в образцах плодовых тел, отобранных в сосняках Перовского лесничества Национального парка «Шушенский бор»

Исходные данные образцов		Информация о гомологичных последовательностях в базе данных BLAST
Квартал взятия	Объект обнаружения	
19	Погибший подрост	JF411709.1
21	Сухостойное дерево (43 см*)	KC768081.1
21	Сильно ослабленное дерево (52 см)	JF411709.1
10	Усыхающее дерево (33 см)	MH859050.1
27	Погибший подрост	MH859050.1
14	Ветровальное дерево (39 см)	MH859050.1
8	Сухостойное дерево (51 см)	MH859050.1
8	Погибший подрост	MH859050.1

* Диаметр ствола на высоте 1,3 м.

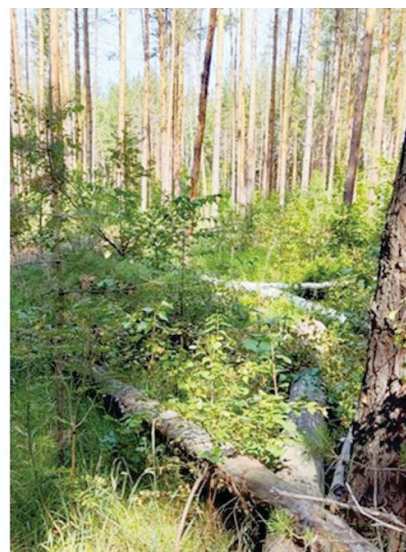
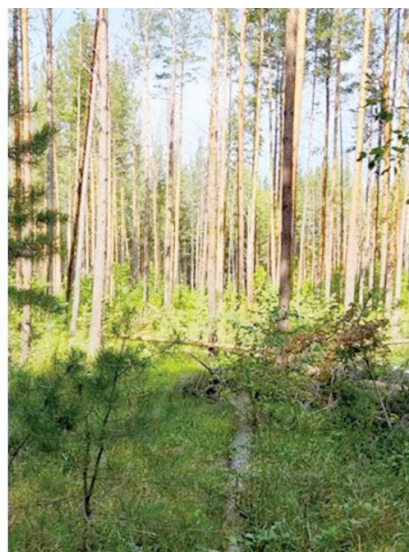


Рис. 2. Действующий очаг корневой губки в сосняках Перовского лесничества

речь о развитии очагов корневой гнили. Проведенные в 2014 году исследования с использованием классических методов показали, что наиболее вероятным возбудителем корневой гнили в сосняках Перовского лесничества является *H. annosum* (Fr.) Bref., относящийся к комплексу *H. annosum* s. l. (корневая губка) [5]. Присутствие данного фитопатогенного гриба в сосновых насаждениях Минусинской котловины подтверждено нами на основе проведения молекулярно-генетического анализа методом секвенирования ДНК патогена.

Заключение

Таким образом, по результатам обследования древостоев сосны обыкновенной в шести кварталах Перовского лесничества национального парка «Шушенский бор» были выявлены деревья, зараженные *H. annosum*. Проведенное исследование показало, что ДНК-анализ является современным и достоверным методом диагностики инфекционных болезней лесобразующих древесных растений, который должен повысить эффективность фитопатологических исследований в системе мониторинга состояния лесов.

Литература

Список русскоязычной литературы

1. Василяускас АП. Корневая губка и устойчивость экосистем хвойных лесов. Вильнюс: Мокслас; 1989.
2. Негруцкий СФ. Корневая губка. М.: Агропромиздат; 1986.
3. Павлов ИН, Корхонен К, Губарев ПВ, Черепнин ВЛ, Барабанова ОА, Миронов АГ, Агеев АА. Закономерности образования очагов *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref. s. str. в географических культурах сосны обыкновенной (Минусинская котловина). Хвойные бореальной зоны. 2008;25(1-2):28-36.
4. Падутов ВЕ, Баранов ОЮ, Воропаев ЕВ. Методы молекулярно-генетического анализа. Мн.: Юнипол; 2007.
5. Татаринцев АИ, Каленская ОП, Бубликов АГ. К вопросу пораженности корневой гнилью сосняков минусинской котловины. Хвойные бореальной зоны. 2015;33(5-6):240-7.
6. Федоров НИ. Лесная фитопатология. Мн.: БГТУ; 2004.

Общий список литературы/Reference List

1. Vasilyauskas AP. Kornevaya Gubka i Ustoychivost Eksistem Khvoynykh Lesov. [Root Sponge and Ecosystem Stability of Coniferous Forests]. Vilnius: Mokslas; 1989. (In Russ.)
2. Negrut sky SF. Kornevaya Gubka. [Root sponge]. Moscow: Agropromizdat; 1986. (In Russ.)
3. Pavlov IN, Korhonen K, Gubarev PV, Cherepnin VL, Barabanova OA, Mironov AG, Ageev AA. [Regularities in the formation of disease foci of *Heterobasidion* root rot in provenance plantations of *Pinus sylvestris* in Minusinskaya hollow, Krasnoyarsk region]. *Khvoynye Borealnoy Zony*. 2008;25(1-2): 28-36. (In Russ.)
4. Padutov VE, Baranov OYu, Voropayev EV. *Metody Molekuliarno-Geeticheskogo Analiza*. [Methods of Molecular Genetic Analysis]. Minsk: Yunipol; 2007. (In Russ.)
5. Tatarintsev AI, Kalenskaya OP, Bublikov AG. [On the issue of root-rot infestation of pine forests of the Minusinsk basin]. *Khvoynye Borealnoy Zony*. 2015;33(5-6):240-7. (In Russ.)
6. Fedorov NI. *Lesnaya Fitopatologiya*. [Forest Phytopathology]. Minsk: BSTU; 2004. (In Russ.)
7. Doyle JJ, Doyle JL. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*. 1990;12:13-5.
8. Korhonen K. Fungi belonging to the genera *Heterobasidion* and *Armillaria* in Eurasia. In: Storozhenko VG, Krutov VI, eds. *Fungal Communities in Forest Ecosystems*. Moscow-Petrozavodsk; 2004. Vol. 2, p. 89-113.
9. Korhonen K, Fedorov NI, La Porta N, Kovbasa NP. The S type of *Heterobasidion annosum* attacks *Abies sibirica* in the Ural region. *Eur J Forest Pathol*. 1997;(27):273-81.
10. Niemelä T., Korhonen K. Taxonomy of the genus *Heterobasidion*. In: Woodward S, Stenlid J, Karjalainen R, Hüttermann A, eds. *Heterobasidion annosum*. Biology, Ecology, Impact and Control. CAB International, 1998.
11. White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, eds. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. San Diego: Acad. Press; 1990. P. 315-22.