

МЕТАГЕНОМНЫЙ АНАЛИЗ ГРИБНЫХ ФИТОПАТОГЕНОВ ПОСАДОЧНОГО МАТЕРИАЛА БЕРЕЗ

УДК 630*232.328.9:630*161.4

Аннотация. Приведены данные о метагеномной технологии, позволяющей за один цикл устанавливать весь спектр организмов в экспериментальном образце, в то время как ранее требовалось отдельное исследование для каждого потенциально содержащегося компонента. Представлен комплексный подход как метод ранней диагностики возбудителей основных грибных заболеваний при фитопатологическом скрининге растений березы повислой (*Betula pendula* Roth) и березы пушистой (*Betula pubescens* Ehrh.), основанный на оценке размера внутренних транскрибированных спейсеров (ITS1 и ITS2) в кластере генов 18S-5.8S-28S рДНК с учетом специфичности величины спейсеров рДНК-оперона, постоянной для большинства видов микромицетов, а также возможности электрофоретического анализа ITS1- и ITS2-локусов, который позволяет проводить видовую идентификацию доминирующих видов фитопатогенных грибов березы в условиях *in planta*.

Ключевые слова: береза, грибные фитопатогены, ITS, фитопатологический скрининг, метагеномная технология.

Для цитирования: Падутов В. Метагеномный анализ грибных фитопатогенов посадочного материала берез // Наука и инновации. 2022. №3. С. 66–70. <https://doi.org/10.29235/1818-9857-2022-3-66-70>



Владимир Падутов,
заведующий
научно-исследовательским отделом генетики,
селекции и биотехнологии Института леса
НАН Беларуси, член-корреспондент;
forestgen@mail.ru

Береза повислая (*Betula pendula* Roth) и береза пушистая (*Betula pubescens* Ehrh.) – одни из наиболее распространенных лесобразующих видов в Беларуси, занимающие 23,4% лесопокрытой площади [1]. Кроме их массового использования в лесовосстановлении и лесоразведении в последнее время особое внимание уделяется селекционной работе по отбору и выведению форм с особыми хозяйственно ценными признаками. Однако семенное размножение элитных деревьев и декоративных форм зачастую сопряжено со снижением уровня проявления или утратой в потомстве селективируемых признаков вследствие их полигенной природы. Наиболее оптимальное решение данного вопроса – применение

технологии микрклонального размножения, поскольку данный способ получения посадочного материала позволяет в промышленном объеме получать генетически однородные, свободные от возбудителей заболеваний микрорастения (рис. 1).

Независимо от того, что является целью лесокультурных работ – обычные лесные культуры берез или специализированные плантационные (рис. 2), для предотвращения возникновения и развития инфекции при выращивании посадочного материала (как семенного происхождения, так и вегетативно размноженного) наряду с соблюдением всех норм агротехнологии необходимо проведение оценки фитосанитарного состояния растений. Наиболее современными и перспективными способами диагностики и идентификации различных видов фитопатогенов выступают методы, основанные на использовании технологии ДНК-анализа. В области фитопатологии их преимущества перед остальными группами методов заключаются в ранней диагностике болезней, точности определения и скорости выполнения анализов [2]. Особые достоинства их применения связаны с возможностью непосредственной оценки зараженности выращиваемого материала, анализа эффективности проведения профилактических и защитных мероприятий,

выявления потенциальных источников инфекции (почвы, воды, насекомых и др.).

Одним из широко используемых фрагментов ДНК для проведения диагностики и видовой идентификации микромицетов являются локусы рибосомальной ДНК (рДНК) [3]. В первую очередь это связано с их мультикопийностью – в каждой клетке содержится от 50 и более копий данных локусов, что увеличивает разрешающую способность ПЦР-анализа, то есть вероятность выявления патогена при его низкой концентрации в ткани. Вторым положительным моментом выступает их консервативность в пределах одного вида, которая дает возможность определять таксономическую принадлежность инфекции. В-третьих, данные локусы хорошо изучены и их нуклеотидные структуры для разных видов широко представлены в генных банках, что также весьма важно для идентификации.

Проведенные широкомасштабные молекулярно-генетические исследования различных грибных организмов позволили установить консервативные области рДНК и на их основе разработать наборы универсальных праймеров для ПЦР-амплификации рибосомальных генов и межгенных спейсеров [4]. На основании особенностей нуклеотидной структуры созданы способы видовой идентификации грибов без проведения предварительного секвенирования образцов – на основе электрофоретической оценки размеров регионов ДНК, используемых в качестве маркеров.

Следует отметить, что большинство предложенных протоколов проведения анализа не универсальны и имеют ограничения при выполнении фитопатологической диагностики различного типа. Так, использование в качестве ДНК-маркера

межгенного спейсера (IGS) может быть ограничено при работе с патогенными базидиомицетами вследствие широкого диапазона варьирования данного региона и невозможностью амплификации локусов размером, превышающим 3 тыс. пар нуклеотидов (в частности, при анализе деградированных тканей) [5]. SSCP-анализ не позволяет напрямую прибегать к данным нуклеотидной структуры локусов, что, соответственно, сужает возможности электронных баз данных в качестве диагностикумов [6]. В случае работы в сложных условиях пробоподготовки и электрофоретического фракционирования возрастает вероятность возникновения методических ошибок и получения разного рода артефактов [7]. Кроме того, применение многокомпонентных методик ограничивает возможности ДНК-маркирования вследствие высокой себестоимости анализов и необходимости наличия соответствующей лабораторной базы.

В настоящей работе в качестве маркерных локусов для анализа предложено рассматривать внутренние транскрибируемые спейсеры ITS1 и ITS2, изменчивость которых с диагностической точки зрения информативна и достаточна для идентификации доминирующих видов патогенов. При этом внутривидовой полиморфизм, связанный с вариабельностью размера транскрибируемых спейсеров микромицетов, практически отсутствует, что исключает получение ложноотрицательных результатов. Анализ размера ампликонов осуществляется в условиях денатурирующего полиакриламидного гель-электрофореза, что позволяет проводить видовую идентификацию с применением стандартных ДНК-образцов (диагностикумов), а также использовать материалы электронных баз данных.



Рис. 1. Микроклонально размноженный посадочный материал берез



Рис. 2. Лесные культуры берез

Разработка метода ранней диагностики и идентификации доминирующих грибных фитопатогенов посадочного материала березы повислой и березы пушистой включала в себя следующие этапы исследований:

- *определение перечня доминирующих типов заболеваний посадочного материала берез, включая видовую идентификацию возбудителей;*
- *анализ и установление видоспецифических особенностей (размера) маркерных регионов доминирующих видов фитопатогенов;*
- *описанию предлагаемого способа диагностики и интерпретация получаемых результатов.*

Посадочный материал берез с признаками различных типов поражения (рис. 3а, б) был собран в условиях закрытого и открытого грунта на территории Корневской экспериментальной лесной базы Института леса НАН Беларуси и лесхозов Министерства лесного хозяйства Республики Беларусь.

В ходе фитопатологического мониторинга был определен доминирующий состав заболеваний, наносящих наибольший урон в условиях промышленного производства. Среди них можно выделить болезни листьев – охряную, бурую и черную пятнистость, мучнистую росу, ржавчину; побегов – некротические и раковые патологии; корней и сосудистой системы – гниль, вилт [8]. Типы болезней устанавливались на основании диагностируемой симптоматики в соответствии с общепринятой системой фитопатологического анализа [9]. Частоты встречаемости различных типов заболеваний от общего числа инфицированных растений приведены в табл. 1.

Определение видового состава фитопатогенных микромицетов было выполнено на основании молекулярно-генетических методов [10], которые использовались для идентификации грибов в условиях *in planta*. Для диагностики возбудите-

лей болезней в растительном материале отбирались ткани на начальной степени поражения, что связано с меньшим содержанием сопутствующей сапротрофной микрофлоры, усложняющей диагностику. Все растительные образцы фиксировались в стерильных полипропиленовых пробирках, содержащих 70%-ный спирт. В ходе пробоподготовки пораженные части растений извлекались из пробирок, тщательно промывались проточной водой, затем для дальнейшей обработки отделялись наиболее типичные по форме поражения фрагменты. Выделение суммарной ДНК осуществлялось на основании модифицированного СТАВ-протокола [10]. Полимеразную цепную реакцию проводили с помощью ПЦП-смеси 2×DreamTaq™ Green PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific). Для секвенирования ампликонов использовался генетический анализатор ABI Prism 310 (Life Technologies) в соответствии с рекомендациями компании-производителя. Видовая идентификация последовательностей осуществлялась с применением онлайн-сервиса BLAST в базе данных GenBank NCBI.

В ходе молекулярно-генетического анализа в большинстве (>80%) инфицированных растительных образцов тканей были диагностированы мультивидовые спектры микромицетов. Несмотря на наличие видовых ассоциаций, наибольшим количеством обычно характеризовался какой-либо один или несколько видов грибов. В результате молекулярно-фитопатологического анализа был установлен видовой перечень доминирующих фитопатогенных грибов, представленный 12 наименованиями (табл. 2). При этом самые распространенные возбудители заболеваний встречались как в составе видовых ассоциаций (в преобладающем количестве), так и по отдельности, что указывает на ведущую роль данных грибов в формировании патогенеза. В то же время оставшиеся минорные микромицеты наблюдались нерегулярно и исключительно в составе сообществ. По результатам видовой идентификации они относились к группам вторичных патогенов или сапрофитных грибов.

Анализ нуклеотидной структуры ампликонов для доминирующих фитопатогенов, получаемых в ходе ПЦП с использованием праймеров ITS1-ITS4 и представленных регионом рДНК (18SRNA(фрагмент)-ITS1-5,8SRNA-ITS2-28SRNA(фрагмент)), показал, что все виды характеризуются уникальным нуклеотидным составом и размером маркерной области. При этом наибольшим уровнем варьирования размера ДНК-последовательностей характеризуются внутренние транскрибируемые спейсеры ITS1

Таблица 1.

Встречаемость инфекционных типов заболеваний в изученном инфицированном посадочном материале березы повислой и березы пушистой

Тип болезни	Встречаемость, %
Мучнистая роса листьев	23,2
Ржавчина листьев	18,9
Вилт растений	14,6
Некроз побегов	11,5
Гниль корней	8,3
Рак побегов	6,9
Бурая пятнистость листьев	4,8
Охряная пятнистость листьев	5,7
Черная пятнистость листьев	5,2
Другие заболевания	0,9



Рис. 3. Листья берез с признаками поражения различного типа

и ITS2. Размеры гена 5,8S RNA и фрагментов генов 18S RNA и 28S RNA различались в незначительной степени, а основные типы межвидовых отличий были связаны с нуклеотидными замещениями.

Исходя из полученных на предыдущих этапах исследований результатов, связанных с определением перечня доминирующих видов фитопатогенных микромицетов и их генетических характеристик, был предложен следующий алгоритм молекулярно-генетической диагностики, основанный на анализе длины маркерных локусов ITS1 и ITS2 доминирующих фитопатогенов и позволяющий проводить идентификацию микромицетов без дополнительной расшифровки нуклеотидной структуры и ее сопоставления с генетическими базами данных:

- выделение суммарной ДНК из инфицированных растений сеянцев и саженцев березы;
- ПЦР-амплификация суммарной ДНК с использованием следующего сочетания праймеров: ITS1-ITS2 (18SRNA-ITS1–5,8SRNA) или ITS3-ITS4 (5,8SRNA-ITS2–28SRNA). В случае применения генетических анализаторов каждый прямой праймер должен быть помечен флюоресцентным красителем;
- электрофоретический анализ в денатурирующем геле с использованием дискретной системы (не менее 1 нуклеотида) типирования;
- видовая идентификация на основании сопоставления длин ампликонов с данными, представленными в табл. 3.

ДНК-спектры посадочного материала берез в случае отсутствия грибной инфекции будут содержать одну электрофоретическую зону – ампликон растения-хозяина, что связано с гомологией нуклеотидных последовательностей в местах отжига праймеров ITS1, ITS2, ITS3 и ITS4 (регионы генов 18S, 5,8S и 28S рРНК покрытосеменных растений). Так, размер фрагментов при использовании праймеров ITS1-ITS2 будет составлять 299 пар нуклеотидов (п.н.),

ITS3-ITS4–411 п.н. Данная диагностическая особенность используется в качестве внутреннего контроля протекания ПЦР-реакции. Отсутствие электрофоретической фракции растения-хозяина (*Betula spp.*) в ПЦР-спектре указывает на нарушение технологии молекулярно-фитопатологического анализа. В случае наличия инфекции ДНК-спектры образцов содержат более одной электрофоретической фракции, одна из которых представлена ДНК растения-хозяина (размер указан выше), остальные относятся к фитопатогенной или сапрофитной инфекции. Идентификация того или иного вида фитопатогена устанавливается на основании наличия соответствующей ему зоны (табл. 3) в ПЦР-спектре образцов суммарной ДНК.

Типичные электрофоретические спектры инфицированных образцов березы представлены на рис. 4. Для увеличения разрешающей способности метода рекомендуется проведение электрофоретического

Вид фитопатогена	Тип болезни	Встречаемость, %
<i>Phyllactinia guttata</i>	Мучнистая роса листьев	13,2
<i>Microspheera betulae</i>	Мучнистая роса листьев	10,0
<i>Melampsorium botulinum</i>	Ржавчина листьев	18,9
<i>Fusarium avenaceum</i>	Вилт растений	13,2
<i>Nectria sp.</i>	Некроз побегов	4,1
<i>Melanconium bicolor</i>	Некроз побегов	3,7
<i>Phytophthora cactorum</i>	Некроз побегов	3,5
<i>Pythium sp.</i>	Гниль корней	7,6
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	Рак побегов	6,2
<i>Ophiognomonium intermedia</i>	Бурая пятнистость листьев	4,8
<i>Sphaerulina betulae</i>	Охряная пятнистость листьев	5,7
<i>Alternaria alternata</i>	Черная пятнистость листьев	4,9
Другие виды	Другие заболевания	0,9

Таблица 2. Доминирующие виды фитопатогенов и их встречаемость в изученном инфицированном посадочном материале березы повислой и березы пушистой

Вид фитопатогена	ITS1-ITS2	ITS3-ITS4
<i>Sphaerulina betula</i> Quaedvl., Verkley ex Crous	225	231
<i>Ophiognomonium intermedia</i> (Rehm) Sogonov	268	351
<i>Alternaria alternata</i> (Fr.) Keissl.	244	346
<i>Phyllactinia guttata</i> (Wallr.) Lev.	314	364
<i>Botryosphaeria dothidea</i> (Moug. ex Fr.) Ces. & De Not.	259	344
<i>Microspora betulae</i> Magn.	298	362
<i>Melampsorium betulinum</i> (Pers.) Kleb.	328	406
<i>Pythium</i> sp.	298	633
<i>Phytophthora cactorum</i> (Leb. and Cohn) Schroeter	295	602
<i>Fusarium avenaceum</i> (Fr.) Sacc.	233	355
<i>Melanconium bicolor</i> Nees.	270	349
<i>Nectria</i> sp.	217	348

Таблица 3. Видоспецифические размеры (в п.н.) диагностических локусов (при использовании различных сочетаний праймеров) доминирующих фитопатогенных грибов посадочного материала березы повислой и березы пушистой

типирования образцов с применением ПЦР-продуктов, полученных с альтернативными сочетаниями праймеров: ITS1-ITS2 и ITS3-ITS4. Кроме того, имеется возможность мультиплексного анализа ампликонов, образованных с использованием различающихся по спектрам флуоресценции красителей меченых праймеров.

Представленный молекулярно-генетический метод типировки характеризуется быстротой выполнения (4–5 часов) и меньшей стоимостью (≈3 долл.) по сравнению с алгоритмами, использующими технологию секвенирования. Достоверность получаемых результатов видовой идентификации выше по сравнению с методами, основанными на применении видо-

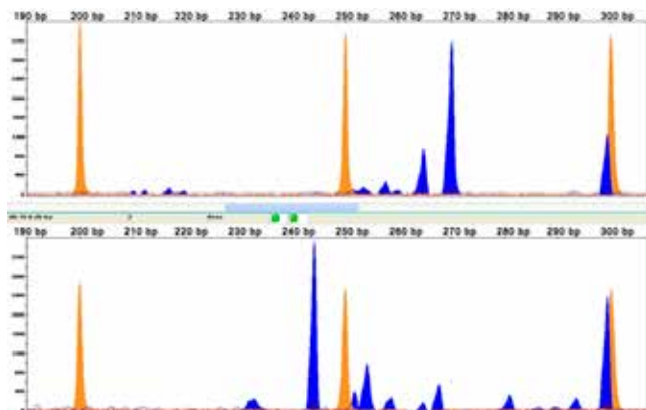


Рис. 4. Электрофоретические спектры грибных ассоциаций инфицированных образцов березы повислой (сочетание праймеров ITS1-ITS2)

специфических праймеров, вследствие отсутствия кросс-амплификации. Данная технология видовой диагностики может быть применима как при работе с чистыми культурами изолятов патогенных грибов, так и при непосредственном анализе растительных тканей и объектов окружающей среды (почва, вода и пр.). При этом в ходе анализа имеется возможность выявлять и описывать не только отдельные виды, но и их сообщества, то есть осуществлять метагеномный подход при анализе патогенетических состояний. ■

■ **Summary.** The data of the is presented. The technology allows to identify the entire spectrum of organisms in an experimental sample per one cycle, while separate study for each potentially contained component previously was required. An integrated approach is submitted as a method for early diagnosis of causative agents of the main fungal diseases during of silver birch (*Betula pendula* Roth) and downy birch (*Betula pubescens* Ehrh.) plants. It based on an estimation of the size of internal transcribed spacers (ITS1 and ITS2) in the 18S-5.8S-28S rDNA gene cluster. Identification of the dominant fungi species phytopathogenic for birch under in planta conditions is possible because of the the specificity of size of the rDNA operon internal transcribed spacers, which is constant for most micromycete species, as well as the possibility of electrophoretic analysis of the ITS1 and ITS2 loci.

■ **Keywords:** birch, fungal phytopathogens, ITS, metagenomic technology, phytopathological screening.

■ <https://doi.org/10.29235/1818-9857-2022-3-66-70>

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Государственный лесной кадастр Республики Беларусь по состоянию на 01.01.2021 года. – Минск, 2021.
2. J. Bakonyi, Z. Á. Nagy, T. É. Rsek. PCR-based DNA Markers for Identifying Hybrids within *Phytophthora alni* // Journal of Phytopathology. 2006. Vol.154(3). P. 168–177.
3. White T.J., Bruns T.D., Lee S.B., Taylor J.W. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics // PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications (M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky, T.J. White eds.). – New York, 1990.
4. J.F. Elder, B.J. Turner, Concerted evolution of repetitive DNA sequences in eukaryotes // The Quarterly Review of Biology. 1995. Vol. 70(3). P. 297–320.
5. M. Arteau, S. Labrie, D. Roy. Terminal-restriction fragment length polymorphism and automated ribosomal intergenic spacer analysis profiling of fungal communities in Camembert cheese // International Dairy Journal. 2010. Vol.20(8). P. 545–554.
6. C. Callon, C. Delbès, F. Duthoit, M.C. Montel. Application of SSCP-PCR fingerprinting to profile the yeast community in raw milk Salers cheeses // Systematic and Applied Microbiology. 2006. Vol. 29(2). P. 172–180.
7. K. Gori, M. Rysse, N. Arneborg, L. Jespersen. Isolation and identification of the microbiota of Danish farmhouse and industrially produced surface-ripened cheeses // Microbial Ecology. 2013. Vol.65(3). P. 602–615.
8. Пантелеев С. В. Молекулярно-генетическая диагностика и идентификация возбудителей микозов посадочного материала древесных видов в лесных питомниках Беларуси: автореф. дис. . . . канд. биол. наук: 06.03.01. – Гомель, 2013.
9. Forest Pathology. Diseases of forest and shade trees // <http://www.forestpathology.org/index.html>.
10. Падутов В. Е., Баранов О. Ю., Воропаев Е. В. Методы молекулярно-генетического анализа. – Минск, 2007.

SEE <http://innosfera.by/2022/03/betula>

Статья поступила в редакцию 19.08.2021 г.