

УДК 632.4: 630*165.3

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ФИТОПАТОЛОГИЯ: СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ И ОСНОВНЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ ДИАГНОСТИКИ БОЛЕЗНЕЙ ДРЕВЕСНЫХ РАСТЕНИЙ

© 2014 г. О. Ю. Баранов

Институт леса Национальной академии наук Беларуси
Республика Беларусь, 246001, Гомель, ул. Пролетарская, 71
E-mail: betula-belarus@mail.ru

Поступила в редакцию 31.07.2014 г.

Рассмотрены перспективы диагностики болезней древесных растений современными методами молекулярной фитопатологии. Описан метагеномный подход, основанный на анализе комплекса возбудителей, включая непатогенную микрофлору. Предложено использование мультикопийных универсальных локусов, характеризующихся некоторыми преимуществами при определении таксономической принадлежности инфекционных агентов в ходе молекулярно-фитопатологического анализа.

Ключевые слова: молекулярная фитопатология, фитопатоген, ДНК-маркеры, эпифитотия, древесные растения.

Одним из современных высокоэффективных методов диагностики и видовой идентификации фитопатогенных микроорганизмов является молекулярно-генетический анализ (Дьяков, 2001). К настоящему времени ДНК-маркеры нашли свое широкое применение и получили длительную апробацию при выявлении и профилактике инфекционных, врожденных и онкологических заболеваний. Несмотря на явные преимущества ДНК-маркеров перед остальными группами методов фитопатологического анализа (такими как ранняя диагностика болезней, точность определения и быстрота выполнения анализов и др.), работа с древесными видами характеризуется определенной спецификой, учет которой в большинстве случаев определяет успешность диагностики патогенов (Падутов, 2007). При этом выбор оптимальной стратегии анализа необходим для каждого элемента диагностики: отбора проб, выбора маркерных регионов ДНК и метода их исследования.

Метагеномный анализ. Общие принципы диагностики возбудителей инфекционных заболеваний сводятся к выявлению генетического материала патогена в тканях хозяина (Дьяков, 2001). Однако большинство фитоза-

болеваний древесных растений имеет комплексную природу и ассоциировано не с одним возбудителем, а с мультивидовым комплексом, включающим патогенную, условно-патогенную и сапрофитную микрофлору. Получаемые данные о видовом и количественном составе ассоциаций микроорганизмов при непосредственной оценке в условиях *in planta* являются более точными по сравнению с косвенной молекулярно-генетической диагностикой через стадию получения чистых культур изолятов патогенов (Дьяков, 2001). Аналогичным базисным принципом характеризуется анализ и потенциальных источников инфекции: почвы, воды, воздуха, соскобов, пыли, растительных остатков и др. Следует отметить, что исходя из методологических принципов анализа непосредственно в ходе типирования производится разделение ассоциации на отдельные виды с последующей их идентификацией и оценкой долевого участия индивидов в микрофлоре. Поэтому изучение комплексных сообществ является более трудоемким по сравнению с исследованием олиговидовых ассоциаций.

Для изучения ассоциаций патогенов наиболее достоверен метагеномный подход, при котором анализируются материалы, полу-

ченные в результате одновременного диагностирования генов и геномов всех микроорганизмов, представленных в инфицированном образце (Charles, 2010). Основными отличиями при использовании метагеномного подхода являются учет и количественная оценка некультивируемых в искусственных условиях, имеющих выраженную специализацию к живым тканям микроорганизмов наряду с культивируемыми.

Как показали многочисленные молекулярно-фитопатологические исследования, в большинстве случаев растительные ткани вне зависимости от степени инфекционной нагрузки, несмотря на мультивидовой характер выявляемых ассоциаций, характеризуются наибольшим удельным весом какого-либо одного или нескольких доминирующих альтернативных видов патогенной и условно-патогенной микрофлоры (Баранов и др., 2012). При этом для доминирующих инфекционных агентов отмечаются устойчивые ассоциации, имеющие корреляцию с теми или иными видами заболеваний и характером поражения растений: единичные, очаговые и эпифитотийные формы, что указывает на ведущую роль видовых сообществ, а не отдельных видов патогенов в развитии заболеваний растений.

Использование универсальных локусов. За последние десятилетия для большого количества хозяйственно важных фитопатогенов расшифрованы некоторые фрагменты их генома, в том числе и универсальные локусы рДНК и мтДНК (White, 1990). Преимуществом универсальных локусов является их консервативность в пределах одного вида, что позволяет определять таксономическую принадлежность инфекции. В настоящее время нуклеотидные последовательности универсальных локусов для различных видов представлены в базах данных геномных банков, и объем данной информации ежедневно пополняется (www.ncbi.nlm.nih.gov). Однако, несмотря на наличие электронного эталонного ресурса для проведения видовой идентификации, использование только представленной генетической информации в качестве основного критерия таксономического типирова-

ния имеет ряд ограничений: для ряда видов лесных фитопатогенов информация в базе данных отсутствует или представлена в неполном объеме; некоторые депонированные образцы имеют спорное видовое обозначение; представленная изменчивость изолятов является индивидуальной и не отражает весь спектр внутривидового полиморфизма.

В случае наличия в базе данных образцов близкородственных таксонов систематическое положение новых видов определяется по уровню генетического сходства (принадлежность к роду, семейству, порядку). В то же время проведение точной видовой идентификации невозможно. Также затруднительно и определение патогенного статуса выявляемого микроорганизма. С данной целью в качестве диагностических маркеров целесообразно использование универсальных локусов, детерминирующих факторы патогенности и вирулентности. При этом наличие тех или иных *pat*- и *vir*-локусов указывает на развитие тех или иных типов заболеваний и характер поражения растений.

Использование мультикопийных локусов. Выявление полной геномной ДНК инфекционного агента – процедура довольно сложная, что связано с трудоемкостью получения препаратов нефрагментированных нуклеиновых кислот, с малыми количествами исследуемой ткани, с отделением ДНК хозяина от ДНК паразита. Вследствие этого диагностику патогена проводят на основании анализа коротких (< 1 тыс. пар нуклеотидов) фрагментов генов или межгенных участков инфекционного агента. Кроме того, наибольшей диагностической ценностью характеризуются мультикопийные локусы (Тоoley, 1997). При этом мультикопийность может быть обусловлена как большим числом дублированных фрагментов, имеющих кластерное или дисперсное распределение в ядерном геноме, так и расположением данных локусов в генетическом аппарате ДНК органоидов, представленных множественным числом. Так, использование внутренних транскрибируемых спейсеров рибосомальных генов в качестве диагностического маркера (в каждой клетке в зависимости от вида микроспоридия содержится от 300 копий и бо-

лее данных локусов) увеличивает разрешающую способность ПЦР-анализа, т. е. вероятность выявления патогена при его низкой концентрации в ткани.

Стратегия отбора проб. Отбор проб для проведения молекулярно-генетических исследований патогенов в основном совпадает с требованиями к проведению микробиологических исследований, однако отличается возможностью длительной консервации образцов в фиксирующих растворах или путем заморозки. В случае оценки жизнеспособности биологических образцов патогена в качестве генетического материала анализируют РНК, а не ДНК. Поскольку для анализа достаточно малого количества биологического материала (2–3 мг тканей растений, 50–100 мг образцов воды и почвы), существуют методические моменты, связанные с репрезентативностью образцов, которые могут быть отчасти решены за счет формирования средней пробы.

Оценка титра патогена. Количественное определение содержания патогена в образце проводится с помощью технологии ПЦР в реальном времени, микрочипов, цифровой ПЦР (Падутов, 2007). Кроме того, анализ титра патогена используется и для оценки устойчивости и толерантности растений. Принцип анализа состоит в сравнительной оценке содержания в тканях растения чужеродной ДНК патогена по отношению к собственной ДНК растения среди различных инфицированных генотипов. Чем ниже это соотношение, тем генотип считается более устойчивым.

Молекулярно-генетические особенности инфицированных тканей. Анализ молекулярно-генетических особенностей инфицированных тканей растений может быть использован в качестве дополнительного способа диагностики фитозаболеваний. Так,

изменение содержания хлДНК и мтДНК может быть эффективным показателем патогенетического статуса растений (Баранов и др., 2013). Альтернативным вариантом диагностики болезней является анализ мультилокусного профиля экспрессии растения-хозяина.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Баранов О. Ю. и др. Молекулярно-генетическая диагностика грибных болезней в лесных питомниках // Лесн. и охот. хоз-во. 2012. № 6. С. 21–29.
- Баранов О. Ю., Ярмолович В. А., Пантелеев С. В. Молекулярно-генетические особенности пораженных шютте тканей хвои сеянцев ели европейской // Современное состояние и перспективы охраны и защиты лесов в системе устойчивого развития: мат-лы Междунар. науч. конф. Институт леса НАН Беларуси. 2013. С. 63–66.
- Дьяков Ю. Т. Общая и молекулярная фитопатология. М.: Об-во фитопатологов, 2001. 301 с.
- Падутов В. Е., Баранов О. Ю., Воронаев Е. В. Методы молекулярно-генетического анализа. Минск: Юнипол, 2007. 176 с.
- Charles T. Metagenomics: theory, methods and applications. Caister Academic Press, 2010. 212 p.
- National Center for Biotechnological Information, NCBI. Mode of access: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank>.
- Tooley P. W. et al. Development of PCR primers from internal transcribed spacer region 2 for detection of *Phytophthora* species infecting potatoes // Appl. Environ. Microbiol. 1997. V. 63. P. 1467–1475.
- White T. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics // PCR protocols: a guide to methods and applications. 1990. P. 315–322.

Molecular Phytopathology: Current Approaches and Main Directions in Diagnostics of Woody Plant Diseases

O. Yu. Baranov

*Institute of Forest, National Academy of Sciences of Belarus
Proletarskaya str., 71, Gomel, 246001 Republic of Belarus
E-mail: betula-belarus@mail.ru*

In the article the authors describe the prospects for diagnosis of woody plants diseases based on the use of modern methods of molecular plant pathology. The metagenomic approach based on the analysis of complex pathogens, including non-pathogenic microflora is described. The use the multicopy universal loci characterized by a number of advantages in determining taxonomic affiliation of infectious agents during phytopathological molecular analysis is proposed.

Keywords: *molecular phytopathology, phytopathogen, DNA markers, epiphytotics, woody plants.*