

Министерство образования Республики Беларусь
Учреждение образования
«Витебский государственный университет имени П.М. Машерова»

УДК582.475:581.2:581.5(476.5)
Рег. №20200654

УТВЕРЖДАЮ
Проректор по научной работе
доктор педагогических наук,
профессор
Аришанский
"30" декабря 2020 г.

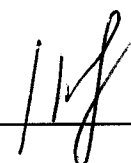


О Т Ч Е Т
О НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ

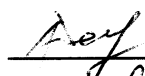
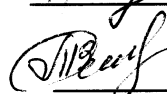
Дотистромоз хвойных (*Dothistroma septosporum*): экология, генетика и оценка степени распространения в Витебской области
(заключительный)

Грант аспирантов, докторантов и студентов
Министерства образования Республики Беларусь

Научный руководитель
НИР, доцент кафедры
зоологии и ботаники,
кандидат
биологических наук

 30.12.2020 П.Ю. Колмаков

Соискатель гранта,
студент
Нормоконтроль

 30.12.2020 В.В. Василевич
 30.12.2020 Т.В. Харкевич

РЕФЕРАТ

Отчёт 42 с., 1 кн., 16 рис., 4 табл., 48 источников, 5 прил.

ДОТИСТРОМОЗ, ФИТОПАТОЛОГИЯ, *DOTHISTROMA SEPTOSPORUM*, *PINUS SYLVESTRIS*, ИНВАЗИВНЫЕ ВИДЫ, ПОЛИМОРФИЗМ, ДНК, ПЦР-ДИАГНОСТИКА, RAPD, ФЕНОЛ-ХЛОРОФОРМНЫЙ МЕТОД

Объект исследования – экземпляры хвои с симптомами дотистромоза.

Цель работы – дать оценку степени распространения дотистромоза хвойных (*Dothistroma septosporum*) в Витебской области на основании морфологической и генетической разнородности образцов

Работа выполнена на базе кафедры зоологии и ботаники учреждения образования «Витебский государственный университет имени П.М. Машерова».

Научная значимость полученных результатов – дана оценка степени распространения и генетической разнородности агрессивного фитопатогена *Dothistroma septosporum*.

Основные результаты работы:

1. Собрано достаточное количество образцов для создания достоверной выборки.
2. Адаптированы методы выделения тотальной ДНК учитывая специфику образцов.
3. Выполнена визуализация полученных результатов и их статистическая обработка.

Полученные знания позволяют выяснить видовой состав патогенных грибов, вызывающих симптомы «red band needle blight», расширить знания о биологии вида, что позволит эффективно проводить мероприятия по контролю численности инвазивных видов патогенных грибов.

Адаптированная для этой работы методика выделения тотальной ДНК и условия проведения ПЦР могут применяться для экологического мониторинга степени гетерогенности очагов заражения дотистромозом.

Социальная и экономическая значимость выполненной работы заключается в том, что её результаты расширяют и углубляют современные знания о текущем состоянии морфогенетической гетерогенности видов фитопатогенных грибов, учитывая, что данное исследование проводится в Республике Беларусь впервые и карантинных мер не предпринималось.

Область применения работы:

- 1) усовершенствование экологического мониторинга гетерогенности инвазии методом ПЦР;

2) дальнейшая разработка методов борьбы и контроля распространения инвазивных видов патогенных грибов исходя из степени их генетической гетерогенности.

Полученные данные могут быть использованы в лесном хозяйстве, садоводстве, в вопросах охраны окружающей среды и зон рекреации.

СОДЕРЖАНИЕ

ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ	5
ВВЕДЕНИЕ	6
Глава 1 Аналитический обзор литературы.....	8
1.1 Теоретический обзор исследуемой проблемы	8
1.2 Использование Mating-type-специфического ПЦР анализа (MAT- diagnostic procedure) для идентификации типов спаривания <i>D. septosporum</i>	9
Глава 2 Материалы и методы исследований.....	11
2.1 Материал исследования	11
2.2 Используемые протоколы выделения тотальной ДНК	13
2.3. Методы экспериментальных исследований	13
2.3.1 Реакционная смесь для постановки RAPD-анализа с праймерами группы ОРА.....	13
2.3.2 Особенности реакции амплификации с праймерами серии ОРА	13
2.3.3 Реакционная смесь для постановки Mating-type-специфического ПЦР анализа	14
2.3.4 Особенности реакции амплификации Mating-type-специфического ПЦР анализа	14
2.3.5 Визуализация амплифицированных участков ДНК в агарозном геле и Gel Doc XR+ BIO RAD	15
2.3.6 Статистическая обработка результатов RAPD-анализа.....	15
Глава 3 Результаты исследований и их обсуждение	16
3.1 Сбор гербарного материала	16
3.2 Образцы выделенной тотальной ДНК	19
3.3 Результаты проведения RAPD-ПЦР	21
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	25
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	27
ПРИЛОЖЕНИЕ А.....	32
ПРИЛОЖЕНИЕ Б	34
ПРИЛОЖЕНИЕ В	36
ПРИЛОЖЕНИЕ Г	40
ПРИЛОЖЕНИЕ Д.....	42

ВВЕДЕНИЕ

В последние два десятилетия возникла острая проблема в связи с распространением инвазивных патогенных заболеваний хвойных пород, вызываемых высокоспециализированными видами грибов. Одной из них является дотистромоз.

Дотистромоз (*Dothistroma needle blight*, DNB), вызывается аскомицетным грибом *Dothistroma septosporum* [1]. Этот фитопатоген опасен для всех возрастов и типов насаждений, как искусственных, так и естественных. Это вызывает значительное замедление роста дерева, а также может привести к его гибели [2]. Молодые искусственные насаждения более подвержены болезням из-за однородности. В Европе это заболевание находится под строгим контролем и вводятся карантинные меры. В Беларуси это заболевание указано как «единично встречаемое» [3, 4].

На протяжении последнего столетия климат на территории Республики Беларусь был стабильным. До 1989 г. периоды потепления сменялись периодами равных похолоданий. Потепление началось с резкого повышения температуры воздуха зимой и продолжается по сей день. Особенность нынешнего потепления не только в его продолжительности, но и в более высокой температуре воздуха, которая в среднем превышала климатическую. За последнее десятилетие изменения климата на севере Беларуси стали наиболее заметными [5]. Принимая во внимание меняющиеся границы агроклиматических районов Республики Беларусь, северная часть (Витебская область) является идеальным примером для изучения инвазии фитопатогенов.

Актуальность проблемы заключается в отсутствии представления о повальной распространённости патогенов и скромным представлением о биологии видов и их жизненных циклах. При этом болезни хвои вызывают потерю деревом, порой до 80% хвои, что вызывает замедление роста и часто приводит к смерти растения, а также наносит огромный вред лесным хозяйствам.

Цель работы – дать оценку степени распространения дотистромоза хвойных (*Dothistroma septosporum*) в Витебской области на основании морфологической и генетической разнородности образцов.

Задачи исследования:

1. Сбор образцов с симптомами дотистромоза.
2. Адаптирование методики и выделение тотальной ДНК из образцов.
3. Подбор оптимальных условий для проведения RAPD-ПЦР при помощи неканонических RAPD-праймеров.
4. Проведение Mating-type-специфического ПЦР анализа. Визуализация результатов цепной полимеразной реакции.

5. Статистическая обработка полученных данных и формирование выводов.

Объект исследования: экземпляры хвои с симптомами дотистромоза.

Предмет исследования: выявление распространения и степени гетерогенности *Dothistroma septosporum*.

Научная новизна: данное исследование в Республике Беларусь на территории Витебской области производилось впервые.

Результаты исследования применимы при экологическом мониторинге очагов заражения дотистромозом и инвазий микопатогенов, планировании землепользования, в других природоохранных и производственных мероприятиях.

Достоверность результатов работы подтверждается корректностью и высокой специфичностью методов исследования; исследования осуществлялись с использованием сертифицированного оборудования.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

- 1 Mesanza, N., Raposo, R., Elvira-Recuenco, M., Hernández-Escribano, L., Barnes, I., van der Nest, A., ... Iturritxa, E. (2019). New Hosts for *Lecanosticta acicola* and *Dothistroma septosporum* in Spain. Preprints, 2019120031. <https://doi.org/10.20944/preprints201912.0031.v1>
- 2 Mullett, M. S., & Brown, A. V. (2018). Effect of dothistroma needle blight on needle and shoot lengths. *Forest Pathology*, 48(1), e12382. <https://doi.org/10.1111/efp.12382>
- 3 Mullett, M., & Barnes, I. (2012). *Dothistroma Isolation and Molecular Identification Methods*. COST ACTION FP1102 Determining Invasiveness and Risk of *Dothistroma* Training School May 2012, Brno, Czech Republic. Retrieved from [www.forestry.gov.uk/pdf/DIAROD_052012_Isolation_and_identification.pdf/\\$FILE/DIAROD_052012_](http://www.forestry.gov.uk/pdf/DIAROD_052012_Isolation_and_identification.pdf/$FILE/DIAROD_052012_)
- 4 <http://cd.intelico.info/invasiveDisease/> (дата обращения 21.12.2020)
- 5 <http://www.pogoda.by/press-release/?page=528> (дата обращения 21.12.2020)
- 6 Barnes, I., Kirisits, T., Akulov, A., Chhetri, D. B., Winfield, B. D., Bulgakov, T. S., & Wingfield, M. J. (2008). New host and country records of the *Dothistroma* needle blight pathogens from Europe and Asia. *Forest Pathology*, 38(3), 178–195. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0329.2007.00536.x>
- 7 Brown, A., & Webber, J. (2008). Red band Needle blight of conifers in Britain. Forestry Commission: Research Note, 8. Retrieved from <https://www.forestry.gov.uk/publications>
- 8 Drenkhan, R., Tomešová-Haataja, V., Fraser, S., Vahalik, P., Mullett, M., Martín-García, J., ... Barnes, I. (2016). Global geographic distribution and host range of *Dothistroma* species: A comprehensive review. *Forest Pathology*, 46(5), 408–442. <https://doi.org/10.1111/efp.12290>
- 9 Evans, H. C. (1984). The genus *Mycosphaerella* and its anamorphs *Cercoseptoria*, *Dothistroma* and *Lecanosticta* on pines. *Mycological Papers*, 153, 1–102.
- 10 Gibson, I. A. S. (1974). Impact and control of dothistroma blight of pines. *European Journal of Forest Pathology*, 4, 89–100. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0329.1974.tb00423.x>
- 11 Kirisits, T., & Cech, T. (2006). Does *Dothistroma* needle blight develop into a forest health problem in Austria? *Forstschutz Aktuell*, 20–26.
- 12 Mullett, M. S., & Brown, A. V. (2018). Effect of dothistroma needle blight on needle and shoot lengths. *Forest Pathology*, 48(1), e12382. <https://doi.org/10.1111/efp.12382>

- 13 Mullett, M. S., Adamson, K., Bragança, H., Bulgakov, T. S., Georgieva, M., Henriques, J., ... Drenkhan, R. (2018). New country and regional records of the pine needle blight pathogens *Lecanosticta acicola*, *Dothistroma septosporum* and *Dothistroma pini*. *Forest Pathology*, 48(5), e12440. <https://doi.org/10.1111/efp.12440>
- 14 Piotrowska, M. J., Riddell, C., Hoebe, P. N., & Ennos, R. A. (2017). Planting exotic relatives has increased the threat posed by *Dothistroma septosporum* to the Caledonian pine populations of Scotland. *Evolutionary Applications*, 11(3), 350–363. <https://doi.org/10.1111/eva.12562>
- 15 Rodas, C. A., Wingfield, M. J., Granados, G. M., & Barnes, I. (2016). *Dothistroma* Needle Blight: An emerging epidemic caused by *Dothistroma septosporum* in Colombia. *Plant Pathology*, 65(1), 53–63. <https://doi.org/10.1111/ppa.12389>
- 16 Watt, M. S., Kriticos, D. J., Alcaraz, S., Brown, A. V., & Leriche, A. (2009). The hosts and potential geographic range of *Dothistroma* needle blight. *Forest Ecology and Management*, 257, 1505–1519. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2008.12.026>
- 17 Welsh, C., Lewis, K. J., & Woods, A. J. (2014). Regional outbreak dynamics of *Dothistroma* needle blight linked to weather patterns in British Columbia, Canada. *Canadian Journal of Forest Research*, 44(3), 212–219. <https://doi.org/10.1139/cjfr-2013-0387>
- 18 Woods, A., Coates, K. D., & Hamann, A. (2005). Is an unprecedented *Dothistroma* needle blight epidemic related to climate change? *Bio Science*, 55, 761–769. [https://doi.org/10.1641/0006-3568\(2005\)055\[0761:IAUDNB\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1641/0006-3568(2005)055[0761:IAUDNB]2.0.CO;2)
- 19 Woods, A. J., Martín-García, J., Bulman, L., Vasconcelos, M. W., Boberg, J., La Porta, N., ... Diez, J. J. (2016). *Dothistroma* needle blight, weather and possible climatic triggers for the diseases recent emergence. *Forest Pathology*, 46(5), 443–452. <https://doi.org/10.1111/efp.12248>
- 20 Houston Durrant, T., de Rigo, D., & Caudullo, G. (2016). *Pinus sylvestris* in Europe: Distribution, habitat, usage and threats. In: J. San-Miguel-Ayanz, D. de Rigo, G. Caudullo, T. Houston Durrant, & A. Mauri (Eds.)
- 21 Navasaitis, M., Ozolinčius, R., Smaliukas, D., & Balevičienė, J. (2003). Lietuvos dendroflora (Dendroflora of Lithuania), Kaunas, 576 p. [In Lithuanian].
- 22 Adamson, K., Mullett, M. S., Solheim, H., Barnes, I., Müller, M., Hantula, J., ... Drenkhan, R. (2018). Looking for relationship between the populations of *Dothistroma septosporum* in northern Europe and Asia. *Fungal Genetics and Biology*, 110, 15–25. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2017.12.001>
- 23 Boron, P., Lenart-Boroń, A., Mullett, M., Kraj, W., Grad, B., & Kowalski, T. (2019). Temporal changes in the population structure of *Dothistroma septosporum* at the site of

the first recorded outbreak in Poland. *Plant Pathology*, 68(2), 383–391. <https://doi.org/10.1111/ppa.12947>

24 Kranjec-Orlović, J., Milošić, L., Kolar, A., Boljfečić, M., Vucelja, M., Diminić, D. (2019). Causative agent of Red Band Needle Blight (*Dothistroma* spp.) in forest plantations of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) and Austrian pine (*Pinus nigra* J.F. Arnold) in the area of forest offices Pazin and Đurđevac. *Nova Mehanizacija Sumarstva*, 39(1), 25–34.

25 Bednářová, M., Palovčíková D., & Jankovský, L. (2006). The host spectrum of *Dothistroma* needle blight *Mycosphaerella pini* E. Rostrup – new hosts of *Dothistroma* needle blight observed in the Czech Republic. *Journal of Forest Science*, 52, 30–36.

26 Boron, P., Lenart-Boroń, A., Mullett, M., Kraj, W., Grad, B., & Kowalski, T. (2019). Temporal changes in the population structure of *Dothistroma septosporum* at the site of the first recorded outbreak in Poland. *Plant Pathology*, 68(2), 383–391. <https://doi.org/10.1111/ppa.12947>

27 Drenkhan, R., Hantula, J., Vuorinen, M., Jankovský, L., & Müller, M. (2013). Genetic diversity of *Dothistroma septosporum* in Estonia, Finland and Czech Republic. *European Journal of Plant Pathology*, 136(1), 71–85. <https://doi.org/10.1007/s10658-012-0139-6>

28 Fraser, S., Brown, A. V., & Woodward, S. (2015). Intraspecific variation in susceptibility to *dothistroma* needle blight within native

29 Millberg, H., Hopkins, A. J. M., Boberg, J., Davydenko, K., & Stenlid, J. (2016). Disease development of *Dothistroma* needle blight in seedlings of *Pinus sylvestris* and *Pinus contorta* under Nordic conditions. *Forest Pathology*, 46(5), 515–521. <https://doi.org/10.1111/efp.12242>

30 Müller, M. M., Hantula, J., & Vuorinen, M. (2009). First observations of *Mycosphaerella pini* on Scots pine in Finland. *Plant Disease*, 93(3), 322. <https://doi.org/10.1094/PDIS-93-3-0322B>

31 Solheim, H. (2012). *Mycosphaerella pini*/*Dothistroma septosporum*, nyinva derende art for Norge. *Agarica*, 32, 29–35. [in Norway].

32 Solheim, H., & Vuorinen, M. (2011). First report of *Mycosphaerella pini* causing red band needle blight on scots pine in Norway. *Plant Diseases*, 95(7), 875.1. <https://doi.org/10.1094/PDIS-02-11-0129>

33 Doroguine, G. (1911). Une mala diecryptogamique du Pin. *Bulletin Trimestriel de la Société de France*, 27, 105–106.

34 Barnes, I., Wingfield, M. J., Carbone, I., Kirisits, T., & Wingfield, B. D. (2014). Population structure and diversity of an invasive pine needle pathogen reflects anthropogenic activity. *Ecology and Evolution*, 4(18), 3642–3661. <https://doi.org/10.1002/ece3.1200>

- 35 Ennos, R. A., Sjökvist, E. I., Piotrowska, M. J., Riddell, C., & Hoebe, P. N. (2020). Using genome resequencing to investigate racial structure, genetic diversity, sexual reproduction and hybridisation in the pine pathogen *Dothistroma septosporum*. *Fungal Ecology*, 45, e100921. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2020.100921>
- 36 Mullett, M. S., Brown, A. V., Fraser, S., Baden, R., & Tubby, K. V. (2017). Insights into the pathways of spread and potential origins of *Dothistroma septosporum* in Britain. *Fungal Ecology*, 26, 85–98. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2017.01.002>
- 37 Jovaišienė, Z., & Pavilionis, R. (2005). Pine pathogenic fungus (*Mycosphaerella pini*) – a causal agent of red-band needle blight in Lithuania. [In Lithuanian].
- 38 Markovskaja, S., & Treigienė, A. (2009). New data on invasive pathogenic fungus *Dothistroma septosporum* in Lithuania. *Botanica Lithuanica*, 15(1), 41–45.
- 39 Boroń, P., Lenart-Boroń, A., & Mullett, M. (2016). The distribution of *Dothistromaseptosporum* and its mating types in Poland. *Forest Pathology*, 46(5), 489–496. <https://doi.org/10.1111/efp.12262>
- 40 Drenkhan, R., Adamson, K., Jürimaa, K., & Hanso, M. (2014). *Dothistromaseptosporum* on firs (*Abies* spp.) in the northern Baltics. *Forest Pathology*, 44(3), 250–254. <https://doi.org/10.1111/efp.12110>
- 41 Kowalski, T., & Jankowiak, R. (1998). First record of *Dothistroma septospora* (Dorog.) Morelet in Poland: A contribution to the symptomology and epidemiology. *Phytopathologia Polonica*, 16, 16–29.
- 42 EPPO (2019). EPPO Global Database. *Dothistroma pini* distribution. Retrieved from <https://gd.eppo.int/taxon/DOTSPI/distribution/US>
- 43 Mullett, M., & Barnes, I. (2012). *Dothistroma* Isolation and Molecular Identification Methods. COST ACTION FP1102 Determining Invasiveness and Risk of *Dothistroma* Training School May 2012, Brno, Czech Republic. Retrieved from [www.forestry.gov.uk/pdf/DIAROD_052012_Isolation_and_identification.pdf/\\$FILE/DIAROD_052012_](http://www.forestry.gov.uk/pdf/DIAROD_052012_Isolation_and_identification.pdf/$FILE/DIAROD_052012_)
- 44 *Dothistroma* needle blight. Field guide. UK: Forest Research. © Crown copyright 2013. Перевод на русский язык и адаптация: Т. С. Булгаков, Д. Л. Мусолин и А. В. Селиховкин. Санкт-Петербург: СПбГЛТУ, 2015 г.
- 45 S. Markovskaja / Occurrence of *Dothistroma* needle blight in Lithuania and Belarus: the risk posed to native Scots Pine forests / S. Markovskaja, K. Raitelaitytė, A. Kačergius, P. Kolmakov, V. Vasilevich // *Forest Pathology*. – 14.08.2020 // DOI:10.1111/efp.12626

46 Альбертс Б., Молекулярная биология клетки / Б. Альбертс, Д. Брей, Дж. Льюис и др. – 1994. – 127 с.

47 Юрченко Е.О., Синявская М.Г. Основы молекулярного маркирования грибной ДНК / Е.О. Юрченко, М.Г. Синявская. – 2007. – 176 с.

48 Groenewald, M., Barnes, I., Bradshaw, R. E., Brown, A. V., Dale, A., Groenewald, J. Z., ... Crous, P. W. (2007). Characterization and distribution of mating type genes in the *Dothistroma* needle blight pathogens. *Phytopathology*, 97, 825–834. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-97-7-0825>