

УДК 632.4: 630*165.3

РЕЗУЛЬТАТЫ ДНК-ДИАГНОСТИКИ ФИТОПАТОГЕННЫХ ГРИБОВ ЛЕСНЫХ ПИТОМНИКОВ КРАСНОЯРСКОГО КРАЯ И РЕСПУБЛИКИ ХАКАСИЯ

Е. А. Шилкина, М. А. Шеллер, Т. Ю. Раздорожная, А. А. Ибе

Российский центр защиты леса, Центр защиты леса Красноярского края
660036, Красноярск, Академгородок, 50а/2

E-mail: krasgenles@mail.ru, maralexsheller@mail.ru, yuschkova.tatiana@yandex.ru, aaibis@mail.ru

Поступила в редакцию 20.06.2017 г.

Представлены результаты ДНК-диагностики фитопатогенов в 26 лесных питомниках Красноярского края и Республики Хакасия за период с 2014 по 2016 г. Исследовали 1–6-летние растения хвойных пород *Pinus sylvestris* L., *Pinus sibirica* Du Tour и *Picea obovata* Ledeb. По данным молекулярно-генетического анализа, в лесных питомниках исследуемых регионов обнаружены представители 13 родов патогенных и условно-патогенных грибов, вызывающих болезни хвойных растений: *Phoma* Sacc. и *Didymella* Sacc. (фомоз), *Alternaria* Nees (альтернариоз), *Cladosporium* Link (оливково-зеленая плесень, кладоспориоз), *Rhizoctonia* DC. (ризоктониоз), *Lophodermium* Chevall. (шютте настоящее или обыкновенное), *Gremmenia* Korf. (шютте снежное), *Sclerophoma* Höhn. (телеоморфа – *Sydowia* Bres.) (склерофомоз), *Typhula* (Pers.) Fr. (выпревание семян), *Botrytis* P. Micheli ex Pers. (серая гниль), *Gremmeniella* M. Morelet (*Scleroderris* (Fr.) Bonord.) (склеродерриоз), *Septorioides* Quaedvl., Verkley & Crous (пятнистость хвои) и *Epicoccum* Link (эпикоккоз). Из них 7 родов микромицетов встречаются во всех трех охваченных исследованием лесорастительных зонах – таежной, лесостепной и южно-сибирской горной. Чаще всего встречались поражения, вызванные сумчатыми грибами. Некоторые из выявленных болезней ранее не диагностировались. В каждом из питомников патогенная микрофлора представлена одной–семью разновидностями микроскопических грибов, причем на пораженных сеянцах часто присутствовало несколько патогенов одновременно. В процессе работы выявлены доминирующие возбудители, их приуроченность к определенным породам и возрастному составу сеянцев. По частоте встречаемости доминировали такие болезни, как фомоз и шютте (настоящее, обыкновенное). Их удельное обилие составило 30 и 28 % соответственно от всех идентифицированных микозов растений. В связи с климатическими особенностями региона пристального внимания заслуживают фитопатогены – возбудители снежного шютте и выпревания семян.

Ключевые слова: лесное хозяйство, лесные питомники, фитопатогены, фитопатологический мониторинг, ДНК-анализ, хвойные, диагностика болезней.

DOI: 10.15372/SJFS20180202

ВВЕДЕНИЕ

Ежегодные потери сеянцев хвойных пород от болезней составляют как минимум 10–15, чаще 30–45 %, однако они могут достигать и значительно больших масштабов – 40–80, а в отдельных случаях и 85–100 % (Семенкова, Соколова, 1992; Громовых и др., 1997; Громовых, 2002). Доминирование микромицетов в составе микроорганизмов, выделяемых с больных сеянцев, свидетельствует о функциональной значимости

грибов в патологическом процессе, что вызывает необходимость изучения в первую очередь их видового состава и патогенных свойств.

Важным инструментом качественной диагностики заболеваний сеянцев в лесопитомниках служат молекулярно-генетические методы, позволяющие выявлять микрофлору трудноидентифицируемых видов заболеваний на ранней стадии патогенеза и в широком диапазоне (Баранов и др., 2012; Ndobe, 2012; Алимова и др., 2014; Баранов, 2014). Кроме того, использование

ДНК-анализа в микологии – мощный импульс для изучения генотипического разнообразия грибов, критического пересмотра существующих таксономических систем и расширения возможности исследования генетики, экологии, популяционной биологии и вредоносности грибов (Гагкаева и др., 2009; Баранов, 2014).

Цель данного исследования – определение состава фитопатогенов в лесных питомниках Красноярского края и Республики Хакасия методами ДНК-анализа. Проведенная молекулярно-генетическая диагностика – это часть работ по формированию единой базы данных Российского центра защиты леса, по мере наполнения которой планируется картирование ареалов распространения основных возбудителей болезней в лесных питомниках исследуемых регионов. На наш взгляд, это позволит точнее оценивать масштабы явлений, их распространение и будет служить одним из инструментов обеспечения качественного мониторинга и проведения лесовосстановительных работ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

За период 2014–2016 гг. проведено обследование 26 лесных питомников общей площадью 483.76 га: 23 – Красноярского края (439.46 га) и 3 – Республики Хакасия (44.3 га), расположенных в трех лесорастительных зонах (Министерство..., 2016) – таежной, лесостепной и южно-сибирской горной (табл. 1).

С целью отслеживания динамики фитопатологического состояния изучение микрофлоры некоторых питомников проводилось повторно в течение двух–трех лет.

Исследовали растения сосны обыкновенной *Pinus sylvestris* L., сосны кедровой сибирской *P. sibirica* Du Tour и ели сибирской *Picea obovata* Ledeb. 1–6-летнего возраста. Перед отбором образцов проводили осмотр территории питомника, затем равномерно со всей площади (не менее пяти точек отбора) в каждой возрастной группе отбирали по 30 шт. сеянцев с признаками заболеваний (пожелтения, побурения, полегания

Таблица 1. Краткая характеристика мест отбора образцов

Лесорастительная зона	Питомник	Площадь, га	Географические координаты, градусы с. ш. / в. д.
Таежная	Абанский	17.00	56.81 / 96.19
	Большеулуйский	5.00	56.62 / 90.62
	Долгомостовский	8.24	56.74 / 96.79
	Кемский	2.00	57.51 / 93.17
	Маклаковский	50.00	58.35 / 92.37
	Пировский	7.00	57.61 / 92.50
	Решотинский	18.20	56.16 / 97.16
	Тасеевский	24.00	57.21 / 94.93
Лесостепная	Тинский	10.00	56.16 / 96.88
	Богградский	8.00	54.19 / 90.86
	Дзержинский	4.20	56.86 / 95.22
	Иланский	4.20	56.09 / 96.08
	Кемчугский	28.00	56.20 / 92.35
	Маганский	2.85	55.79 / 93.19
	Мининский	8.00	56.06 / 92.52
	Сухобузимский	36.00	56.44 / 93.03
	Таежный	4.40	56.28 / 95.01
	Таловский	5.00	57.22 / 93.15
	Ужурский	11.00	55.32 / 89.87
	Уярский	50.00	55.87 / 94.36
Южно-сибирская горная	Верхнеманский	9.00	55.25 / 94.33
	Горячегорский	10.00	55.36 / 88.87
	Ермаковский	120.00	53.30 / 92.43
	Казырский	9.22	53.81 / 93.81
	Верхнеташтыпский	26.30	52.80 / 89.43
	Шалинский	6.15	55.69 / 93.72

и т. п.), выкапывая их с небольшим комом земли. Для контроля проводили отбор растений без признаков поражения.

ДНК из тканей сеянцев для молекулярно-генетической диагностики выделяли ЦТАБ-методом (Падутов и др., 2007). ПЦР-анализ выполняли с применением готовой смеси ScreenMix-NS (ЗАО «Евроген») согласно инструкции фирмы-производителя. В процессе исследования использовали универсальные праймеры ITS1 и ITS4, фланкирующие регион рДНК: ITS1 – 5.8 S рННК – ITS2 (White et al., 1990). Электрофоретическое разделение ампликонов проводили в 2%-м агарозном геле. Анализируемые ПЦР-продукты вырезали из геля и секвенировали на анализаторе ABI Prism 310 (Applied Biosystems) с использованием набора BidDye Terminator Sequence Kit v. 1.1. в соответствии с протоколом компании-изготовителя.

Нуклеотидные последовательности анализировали в программе BLAST в открытой базе данных на сайте GenBank NCBI (The National Center..., 2017). Для анализа использовали только те результаты, которые имели не менее 99%-е совпадение с данными GenBank. Систематическую принадлежность выявленных грибов анализировали в соответствии с международной базой Index Fungorum (2017), указывая при упоминании таксона в скобках его синонимы, ранее или в настоящий момент широко распространенные в практике лесного хозяйства.

Частоту встречаемости грибов (удельное обилие) рассчитывали как долю суммарного обилия таксона от суммарного обилия всех грибов, выявленных на определенных породах и возрастных группах растений за обозначенный период исследования (Мухина и др., 2014), и оценивали ее как низкую при показателе менее 25 %, как среднюю – от 25 до 50 и как высокую – от 50 % и более.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

По данным молекулярно-генетической диагностики в лесных питомниках Красноярского края и Республики Хакасия за период 2014–2016 гг. обнаружены представители 13 родов патогенных и условно-патогенных грибов – возбудителей болезней посадочного материала: *Phoma* Sacc. и *Didymella* Sacc. (фомоз), *Alternaria* Nees (альтернариоз), *Cladosporium* Link (оливково-зеленая плесень, кладоспориоз), *Rhizoctonia* DC. (ризоктониоз), *Lophodermium* Chevall. (шютте настоящее или обыкновенное), *Gremmenia* Korf.

(шютте снежное), *Sclerophoma* Höhn. (телеоморфа *Sydowia* Bres.) (склерофомоз), *Typhula* (Pers.) Fr. (выпревание сеянцев), *Botrytis* P. Micheli ex Pers. (серая гниль), *Gremmeniella* M. Morelet (*Scleroderris* (Fr.) Bonord.) (склеродерриоз), *Septorioides* Quaedvl., Verkley & Crous (пятнистость хвои) и *Epicoccum* Link (эпикоккоз). Из них 7 родов микромицетов встречаются во всех трех охваченных исследованием лесорастительных зонах (табл. 2). В целом наибольшее видовое разнообразие отмечено в питомниках, расположенных в зоне лесостепи. Кроме того, в составе микрофлоры присутствовали плесневые грибы родов *Rhizopus* Ehrenb., *Aspergillus* P. Micheli и *Penicillium* Link, а также водоросли. В питомниках Хакасии отсутствовали возбудители серой гнили, снежного, обыкновенного и настоящего шютте, склеродерриоза, склерофомоза, выпревания сеянцев и пятнистости хвои, в Красноярском крае не обнаружен эпикоккоз.

В каждом из питомников патогенная микрофлора представлена одной–семью разновидностями микроскопических грибов. На пораженных сеянцах, как правило, одновременно присутствовало несколько фитопатогенов. Чаще всего встречались сумчатые грибы.

Также выявлены многочисленные представители микобиоты, систематическую принадлежность которых удалось определить только на уровне высоких систематических таксонов (семейства и выше), часть полученных нуклеотидных последовательностей не имела значимых совпадений с данными GenBank (The National Center..., 2017). Среди указанных грибов могут быть как сапротрофы и микоризообразователи, так и потенциально опасные патогенные виды, поэтому необходимо принимать во внимание их возможное участие в патологическом процессе.

Оценка приуроченности возбудителей микозов к определенным породам хвойных растений показала, что патогенная микрофлора сеянцев сосны обыкновенной представлена наибольшим числом родов (табл. 3).

Это, главным образом, грибы родов *Lophodermium* и *Phoma* (доминирующие от низкой до высокой частоты встречаемости), а также фитопатогены родов *Typhula*, *Cladosporium*, *Rhizoctonia*, *Alternaria*, *Gremmenia*, *Sclerophoma*, *Didymella* sp. и единичные представители *Botrytis* sp. и *Gremmeniella* sp.

На сеянцах сосны кедровой сибирской выявлены микромицеты девяти родов, среди которых по представленности абсолютно доминирует *Phoma*, также неоднократно отмечены возбудители

Таблица 2. Представленность родов фитопатогенных грибов в питомниках Красноярского края и Республики Хакасия

Род гриба	Красноярский край	Республика Хакасия	Лесорастительная зона
<i>Alternaria</i>	Большеулуйский, Ермаковский, Пировский, Сухобузимский, Таловский	Горячегорский	Таежная, лесостепная, южно-сибирская горная
<i>Botrytis</i>	Кемчугский	Не выявлен	Лесостепная
<i>Cladosporium</i>	Долгомостовский, Ермаковский, Кемчугский, Решотинский, Тасеевский, Шалинский	Горячегорский	Таежная, лесостепная, южно-сибирская горная
<i>Didymella</i>	Долгомостовский, Кемчугский, Мининский, Ужурский	»	Таежная, лесостепная, южно-сибирская горная
<i>Epicoccum</i>	Не выявлен	»	Южно-сибирская горная
<i>Gremmenia</i>	Абанский, Ермаковский, Маклаковский, Решотинский, Таловский	Не выявлен	Таежная, лесостепная, южно-сибирская горная
<i>Gremmeniella</i>	Таловский	То же	Лесостепная
<i>Lophodermium</i>	Абанский, Верхнеманский, Ермаковский, Иланский, Кемский, Кемчугский, Маганский, Маклаковский, Решотинский, Таежный, Таловский, Тасеевский, Ужурский, Шалинский	»	Таежная, лесостепная, южно-сибирская горная
<i>Phoma</i>	Абанский, Большеулуйский, Долгомостовский, Ермаковский, Казырский, Кемчугский, Маклаковский, Мининский, Решотинский, Сухобузимский, Таежный, Таловский, Тасеевский, Тинский, Ужурский, Уярский, Шалинский	Боградский, Горячегорский, Верхнеташтыпский	Таежная, лесостепная, южно-сибирская горная
<i>Rhizoctonia</i>	Решотинский, Тасеевский	Горячегорский, Верхнеташтыпский	Таежная, южно-сибирская горная
<i>Sclerophoma</i>	Абанский, Держинский, Ермаковский, Таловский, Тасеевский	Не выявлен	Таежная, лесостепная, южно-сибирская горная
<i>Septorioides</i>	Таловский	»	Лесостепная
<i>Typhula</i>	Абанский, Кемский, Маганский, Решотинский, Таежный, Тинский	»	Таежная, лесостепная

Таблица 3. Приуроченность фитопатогенов к хвойным растениям-хозяевам

Растение-хозяин	Выявленные роды (виды) микромицетов
<i>Pinus sylvestris</i> L.	<i>Alternaria</i> sp. (<i>A. tenuissima</i> (Kunze) Wiltshire, <i>A. alternata</i> (Fr.) Keissl.), <i>Botrytis</i> sp., <i>Cladosporium</i> sp., <i>Lophodermium</i> sp. (<i>L. seditiosum</i> Minter, Staley & Millar), <i>Gremmenia</i> sp. (<i>G. infestans</i> (P. Karst.) Crous = <i>Phacidium infestans</i> P. Karst.), <i>Phoma</i> sp., <i>Didymella</i> (<i>D. macrostoma</i> (Mont.) Q. Chen & L. Cai, <i>D. glomerata</i> (Corda) Q. Chen & L. Cai), <i>Rhizoctonia</i> sp. (<i>R. solani</i> J.G. Kühn), <i>Gremmeniella</i> sp. (<i>G. abietina</i> (Lagerb.) M. Morelet = <i>Scleroderris lagerbergii</i> Gremmen), <i>Sclerophoma</i> sp. (телеоморфа – <i>Sydowia</i> Bres.), <i>Typhula</i> sp.
<i>Pinus sibirica</i> Du Tour	<i>Alternaria</i> sp., <i>Cladosporium</i> sp., <i>Lophodermium</i> sp. (<i>L. pinastri</i> (Schrad.) Chevall.), <i>Gremmenia</i> sp., <i>Phoma</i> sp., <i>Didymella</i> (<i>D. pomorum</i> (Thüm.) Q. Chen & L. Cai), <i>Rhizoctonia</i> sp. (<i>R. solani</i> J.G. Kühn), <i>Sclerophoma</i> sp. (телеоморфа – <i>Sydowia</i>), <i>Septorioides</i> sp. (<i>S. pini-thunbergii</i> (S. Kaneko) Quaedvl., Verkley & Crous)
<i>Picea obovata</i> Ledeb.	<i>Alternaria</i> sp. (<i>A. tenuissima</i> , <i>A. alternata</i>), <i>Cladosporium</i> sp. (<i>C. herbarum</i> (Pers.) Link), <i>Epicoccum</i> sp., <i>Gremmenia</i> sp., <i>Phoma</i> sp., <i>Didymella</i> (<i>D. macrostoma</i>), <i>Sclerophoma</i> sp. (телеоморфа – <i>Sydowia</i>)

тели склерофомоза. Остальные заболевания отмечаются редко или единично.

На растениях ели сибирской из всех диагностированных заболеваний наиболее часто отмечены фомоз и альтернариоз. Остальные патогены (родов *Gremmenia*, *Cladosporium*, *Sclerophoma* и *Epicoccum*) выявлены на сеянцах указанной породы не более чем в двух партиях анализов.

Таким образом, патогенные микромицеты шести родов – *Phoma*, *Didymella*, *Cladosporium*, *Alternaria*, *Gremmenia* и *Sclerophoma* – встреча-

ются на всех трех анализируемых породах из выращиваемых в настоящее время в питомниках Красноярского края и Республики Хакасия. По частоте встречаемости среди них доминируют возбудители фомозов.

Наиболее часто из больных растений выделялся генетический материал грибов рода *Phoma*. Фомозы с разной частотой встречались на всех изученных породах всех возрастов сеянцев в 17 лесных питомниках Красноярского края и трех – Республики Хакасия, т. е. в 20 из 26 анализируемых лесопитомников (табл. 4, рис. 1).

Таблица 4. Частота встречаемости фитопатогенов в лесных питомниках на хвойных породах разного возраста

Питомник	Древесная порода	Год посева/год анализа	<i>Phoma</i> sp.	<i>Didymella</i> sp.	<i>Alternaria</i> sp.	<i>Cladosporium</i> sp.	<i>Rhizoctonia</i> sp.	<i>Lophodermium</i> sp.	<i>Gremmenia</i> sp.	<i>Sclerophoma</i> sp.	<i>Typhula</i> sp.	<i>Epicoccum</i> sp.	<i>Botrytis</i> sp.	<i>Gremmeniella</i> sp.	<i>Septorioides</i> sp.
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
<i>Красноярский край</i>															
Абанский	К	2011/2014	В	–	–	–	–	–	–	Н	–	–	–	–	–
	С	2012/2015	–	–	–	–	–	–	–	–	В	–	–	–	–
	С	2013/2015	Н	–	–	–	–	С	Н	–	–	–	–	–	–
	С	2014/2014	Н	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Большеулуйский	Е	2014/2014	С	–	С	–	–	–	–	–	–	–	–	–	
Верхнеманский	С	2012/2015	–	–	–	–	–	В	–	–	–	–	–	–	–
	С	2012/2014	–	–	–	–	–	В	–	–	–	–	–	–	–
	С	2013/2015	–	–	–	–	–	В	–	–	–	–	–	–	–
	С	2013/2016	–	–	–	–	–	В	–	–	–	–	–	–	–
Дзержинский	С	2013/2015	–	–	–	–	–	–	С	–	–	–	–	–	
Долгомостовский	С	2013/2014	В	–	–	Н	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	С	2014/2014	С	С	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Ермаковский	К	2011/2014	Н	–	–	–	–	Н	–	Н	–	–	–	–	–
	Е	2011/2014	–	–	–	С	–	–	С	–	–	–	–	–	–
	С	2012/2014	В	–	Н	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	С	2013/2016	–	–	–	–	–	В	–	–	–	–	–	–	–
	С	2014/2016	–	–	С	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Иланский	С	2014/2016	–	–	–	–	–	В	–	–	–	–	–	–	–
Кемский	С	2012/2015	–	–	–	–	–	–	–	–	С	–	–	–	–
	С	2013/2015	–	–	–	–	–	Н	–	–	–	–	–	–	–
Казырский	К	2011/2014	Н	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Кемчугский	С	2013/2014	С	Н	–	Н	–	Н	–	–	–	–	Н	–	–
Маганский	С	2014/2014	–	–	–	–	–	С	–	–	В	–	–	–	–
Маклаковский	С	2011/2014	–	–	–	–	–	В	–	–	–	–	–	–	–
	С	2013/2015	В	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	С	2015/2016	–	–	–	–	–	–	С	–	–	–	–	–	–
Мининский	К	2011/2014	С	Н	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Пировский	К	2011/2014	–	–	С	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Решотинский	С	2011/2014	В	–	–	–	–	–	–	–	В	–	–	–	–
	С	2012/2014	–	–	–	Н	Н	С	–	–	С	–	–	–	–
	С	2012/2015	–	–	–	–	–	–	–	–	Н	–	–	–	–
	С	2013/2016	–	–	–	–	–	В	Н	–	–	–	–	–	–

Окончание таблицы 4

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Сухобузимский	С	2013/2014	В	–	Н	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	С	2014/2014	В	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Таежный	С	2011/2014	–	–	–	–	–	С	–	–	–	–	–	–	–
	С	2013/2015	–	–	–	–	–	С	–	–	В	–	–	–	–
	С	2014/2016	В	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	С	2015/2016	В	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Таловский	С	2011/2014	С	–	–	–	–	–	–	Н	–	–	–	Н	–
	С	2012/2014	–	–	–	–	–	В	–	–	–	–	–	–	–
	С	2013/2016	–	–	–	–	–	С	–	–	–	–	–	–	–
	Е	2011/2014	–	–	–	–	–	–	–	В	–	–	–	–	–
	К	2009/2014	–	–	–	–	–	–	–	С	–	–	–	–	–
	К	2011/2014	Н	–	–	–	–	–	–	В	–	–	–	–	Н
	К	2013/2014	–	–	В	–	–	–	–	В	–	–	–	–	–
Тасеевский	С	2011/2014	–	–	–	–	–	В	–	С	–	–	–	–	–
	С	2014/2014	–	–	–	В	С	–	–	–	–	–	–	–	–
	С	2014/2016	–	–	–	–	–	С	–	–	–	–	–	–	–
	Е	2014/2015	В	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Тинский	С	2011/2014	В	–	–	–	–	–	–	С	–	–	–	–	
Ужурский	С	2011/2014	–	–	–	–	–	Н	–	–	–	–	–	–	–
	С	2013/2014	Н	Н	–	–	–	С	–	–	–	–	–	–	–
Уярский	Е	2012/2014	В	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Шалинский	К	2012/2014	Н	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	С	2012/2015	–	–	–	–	–	Н	–	–	–	–	–	–	–
	С	2013/2015	–	–	–	–	–	Н	–	–	–	–	–	–	–
	Е	2014/2015	С	–	–	Н	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	С	2014/2016	–	–	–	–	–	В	–	–	–	–	–	–	–
С	2015/2016	С	–	–	–	–	–	С	–	–	–	–	–	–	–
<i>Республика Хакасия</i>															
Боградский	К	2010/2014	Н	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Верхнеташтыпский	К	2014/2016	Н	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	С	2016/2016	–	–	–	–	Н	–	–	–	–	–	–	–	–
Горячегорский	К	2013/2014	–	–	–	С	С	–	–	–	–	–	–	–	–
	Е	2013/2014	Н	Н	Н	–	–	–	–	–	–	Н	–	–	–

Примечание. Древесная порода: К – сосна кедровая сибирская; С – сосна обыкновенная; Е – ель сибирская. Частота встречаемости: В – высокая; С – средняя; Н – низкая; прочерк – фитопатоген отсутствует.

Полученные данные согласуются с результатами ряда исследований последних лет, авторы которых указывают на ранее недооцененную роль грибов рода *Phoma* в патогенезе семян хвойных пород (Баранов и др., 2012; Алимова и др., 2014; Баранов, 2014). Одновременно нельзя не отметить, что, по данным зарубежных авторов (Aveskamp et al., 2008; Zimowska, 2011; Golzar et al., 2015), в целом внутри таксона *Phoma* доля патогенных видов считается незначительной.

Поскольку фомозы изучены крайне слабо применительно к патогенной микрофлоре питомников Сибири, изучение их биологии, экологии и патогенных свойств (патогенности, агрессивности, вирулентности, инвазионности,

токсичности, ферментативной активности), несомненно, представляет большой научный и практический интерес. Кроме того, ряд идентифицированных нами видов рода *Didymella*, таких как *D. macrostoma*, *D. glomerata* и *D. pomorum*, ранее относился к роду *Phoma* (*P. macrostoma* Mont., *P. glomerata* (Corda) Wollenw & Hochapfel и *P. pomorum* Thüm. соответственно), что также указывает на актуальность и практическую значимость тщательного изучения таксономии возбудителей фомозов. Второе место по степени доминирования принадлежит грибам рода *Lophodermium*, выявленным в 14 питомниках Красноярского края на посевах сосны (*L. seditiosum*) и кедра (*L. pinastri*) (см. рис. 1).

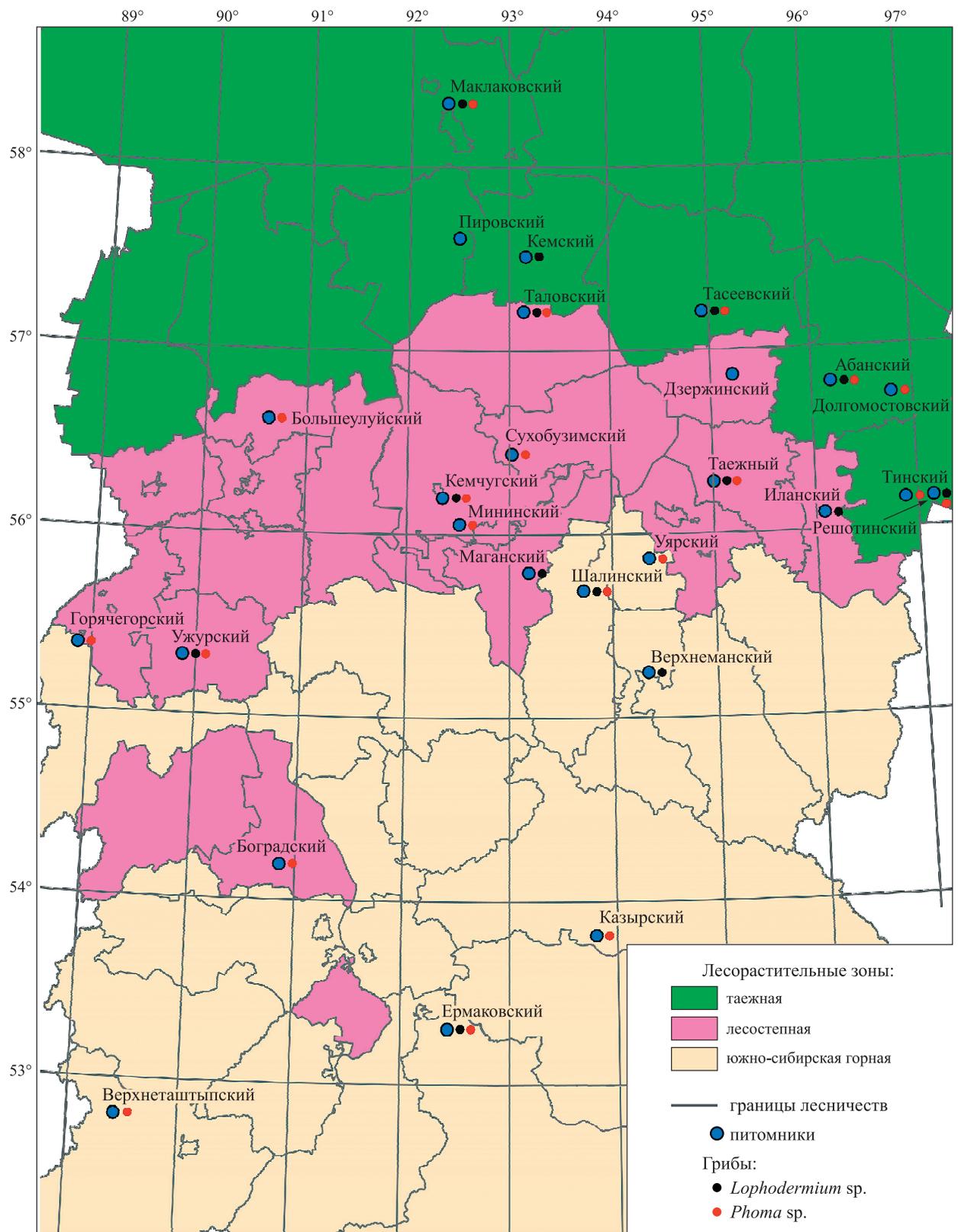


Рис. 1. Встречаемость фитопатогенов родов *Phoma* и *Lophodermium* в питомниках Красноярского края и Республики Хакасия.



Рис. 2. Встречаемость заболеваний в исследуемых питомниках.

Однако в Хакасии возбудители шютте настоящего и обыкновенного за исследуемый период не обнаружены.

Полученные данные согласуются с результатами исследований В. А. Сенашовой (2012), изучавшей фитопатогенные грибы филлосферы на территории Средней и Южной Сибири и отмечавшей высокую встречаемость возбудителей настоящего и обыкновенного шютте на сеянцах, подросте и взрослых растениях хвойных пород в разных лесорастительных зонах, особенно в зонах устройства лесопитомников. И. Д. Гродницкая, Г. В. Кузнецова (2012) также отмечают широкую представленность в питомниках Красноярского края и Хакасии *L. pinastri* и *L. seditiosum* на посевах сосны и кедра.

Согласно нашим исследованиям, частота встречаемости заболеваний фомозом и шютте (настоящим, обыкновенным) была наиболее высокой и составила 30 и 28 % соответственно от всех идентифицированных патогенов растений в обследованных питомниках (рис. 2).

Представители родов *Cladosporium* и *Alternaria* (*A. tenuissima*, *A. alternata*) отмечены в семи и шести лесопитомниках соответственно в обоих субъектах на разных породах с частотой встречаемости от низкой до высокой и составили каждый по 6 % от общего удельного обилия грибов. Кроме того, возбудители кладоспориоза в незначительном количестве представлены в эпифитной микрофлоре здоровых растений. Ранее установлено (Якименко, 1994; Якименко, Гродницкая, 1996; Громовых и др., 1997; Yakimenko, Grodnitskaya, 2000; Громовых, 2002; Гродницкая, Кузнецова, 2012), что указанные микромицеты играют существенную роль в поражении сеянцев хвойных пород в лесных питомниках Сибири.

Стоит отметить, что, по мнению перечисленных авторов, наиболее опасными возбудителями инфекционного процесса, вызывающего полегание сеянцев в питомниках, являются грибы рода *Fusarium*. В наших исследованиях возбудители фузариозов методами ДНК-анализа не выявлены, хотя диагностировались в процессе параллельно проводимых нами работ по определению грибов традиционными микробиологическими (микологическими) методами (Шилкина и др., 2016). В указанном исследовании данную ситуацию мы связываем с трудностями разделения ампликонов различных видов грибов, имеющих близкую молекулярную массу.

Грибы родов *Sclerophoma* и *Gremmenia* диагностированы на всех породах в пяти питомниках только на территории Красноярского края. Также в шести питомниках края исключительно на сеянцах сосны обыкновенной выявлены микромицеты, вызывающие выпревание сеянцев и занимающие 6 % в общем списке заболеваний.

Возбудители снежного шютте (фацидиоза) и выпревания сеянцев, вызываемого грибами рода *Typhula*, заслуживают особого внимания при осуществлении мониторинга питомников Красноярского края, так как значительная часть их территории весьма благоприятна для развития указанных заболеваний.

Особенности развития снежного шютте и его вредоносность для сеянцев сосны подробно описаны И. С. Коссинской (1974). Наличие этого заболевания в питомниках, главным образом на сосне в зоне тайги, отмечено также и в публикациях В. А. Сенашовой (2012) и В. А. Сенашовой и др. (2015). И если фацидиоз относится к числу привычных и часто встречающихся инфекций, подробно описан в научных и прикладных публикациях, успешно диагностируется макро- и микроскопическими методами, по профилактике и борьбе с ним имеются определенные рекомендации, то выпревание сеянцев вследствие воздействия грибов рода *Typhula* (в отличие от выпревания, вызываемого *Sclerotinia borealis* Bubák & Vleuge (*Sclerotinia graminearum* Elenev ex Solkina)) является слабоизученной болезнью на хвойных породах в Сибири и обнаружено нами только с момента внедрения в практику фитопатологического мониторинга методов ДНК-анализа. Недавно проведенные нами исследования показали, что болезнь распространена в питомниках Красноярского края от центральной части региона в направлении на восток и северо-восток (Шилкина, Шеллер, 2017). Она может причинять значительный хо-



Рис. 3. Внешний вид сеянцев *Pinus sylvestris* L., инфицированных склерофомозом. Наблюдаются искривления стволиков.

зыйственный вред посевам хвойных в питомниках: снижение выхода стандартного посадочного материала и гибель сеянцев могут достигать 10–40 % (Кузьмичев и др., 2004). В связи с этим изучение тифулезного выпревания сеянцев, особенностей патогенеза его возбудителей является актуальным для разработки обоснованных приемов профилактики и защиты.

Помимо грибов рода *Typhula* к числу ранее редко диагностируемых фитопатогенов сеянцев в лесопитомниках относятся микромицеты, вызывающие склерофомоз, склеродерриоз, эпикоккоз и ризоктониоз. При этом склерофомоз занимает третье место по частоте встречаемости на изученных территориях и составляет 9 % от числа всех выявленных микозов сеянцев. Стволики сеянцев, инфицированных грибами рода *Sclerophoma*, нередко имели искривления в виде латинской буквы S (рис. 3).

Обычно такой диагностический признак характерен для ржавчины побегов сосны, вы-

зываемой *Melampsora populnea* (Pers.) P. Karst. (в прежней систематике – *Melampsora pinitorqua* Rostr.) (Кузьмичев и др., 2004), однако эти же авторы, а также Э. С. Соколова (1984) отмечают, что искривление стволиков и побегов может отмечаться и при развитии склерофомоза.

Данные о встречаемости склерофомоза в таежной и лесостепной зонах Средней Сибири, в том числе в лесопитомниках, ранее опубликованы В. А. Сенашовой (2012) и В. А. Сенашовой и др. (2015).

Ризоктониоз обнаружен в двух питомниках Красноярского края (на растениях сосны) и двух – Республики Хакасия (на сосне и кедре) и представлен возбудителем *Rhizoctonia solani*. Несмотря на то что общее удельное обилие таксона в общем количестве патогенов составляет только 4 %, болезнь часто упоминается в литературе (Семенкова, Соколова, 1992; Кузьмичев и др., 2004; Громовых и др., 2005 и др.) в составе комплекса потенциальных возбудителей полега-

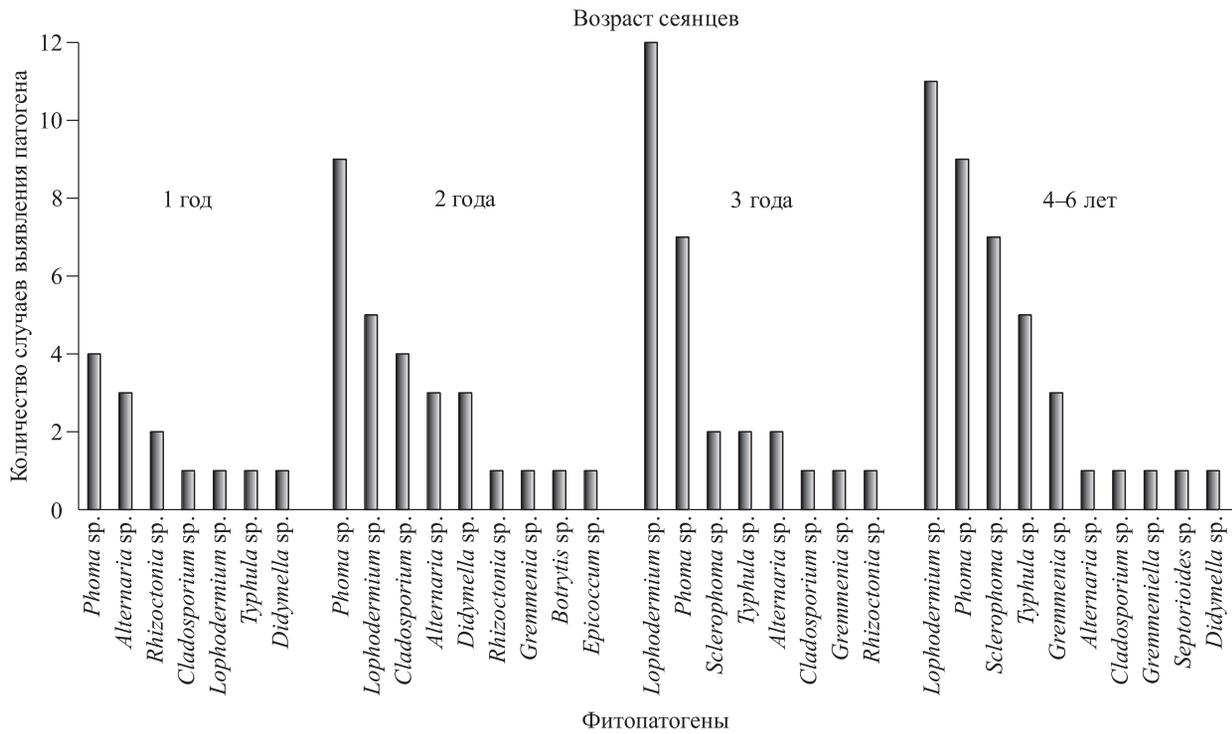


Рис. 4. Количество случаев выявления определенных патогенов у сеянцев разных возрастов в питомниках Красноярского края и Хакасии.

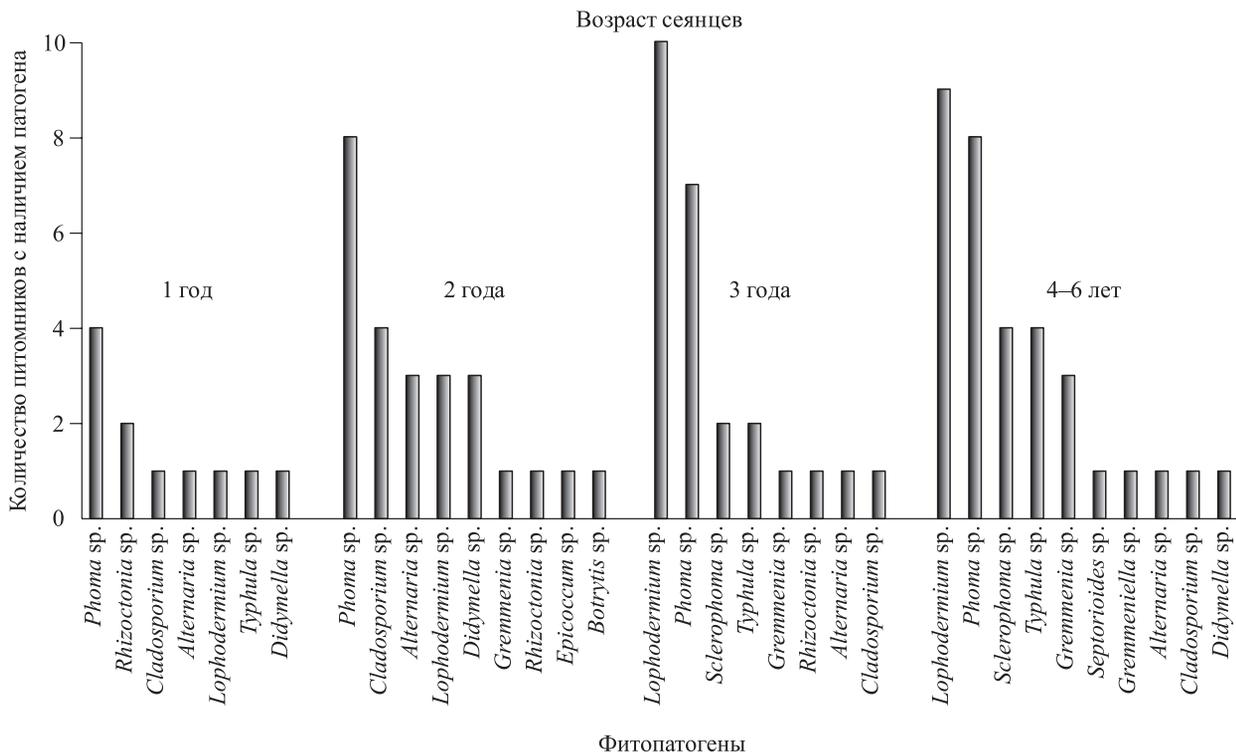


Рис. 5. Число питомников Красноярского края и Хакасии, в которых встречались определенные патогены на сеянцах разных возрастов.

ния семян в питомниках. Однако данный базидиомицет лучше изучен у сельскохозяйственных растений. В патогенезе хвойных пород его роль оценена недостаточно, упоминания грибов рода *Rhizoctonia* как паразитов семян и семян хвойных немногочисленны. В лесопитомниках Средней Сибири грибы этого рода отмечены в почве, но причиняемый ущерб для семян не выявлен (Якименко, 1994; Громовых и др., 2005).

Единично в наших исследованиях отмечены роды *Botrytis* и *Gremmeniella* (*G. abietina*) (= *S. lagerbergii*) на сосне, *Septorioides* (*S. pinithunbergii*) – на кедре в Красноярском крае и *Epicoctum* – на ели в Республике Хакасия.

Имеющаяся выборка не позволяет выявить статистически достоверной корреляции между возрастом семян и заболеваниями, так как в большинстве питомников на момент обследования не было нескольких возрастных групп каждой породы. Однако по количеству случаев выявления фитопатогенов в каждой группе возраста (рис. 4) в целом просматривается доминирование грибов родов *Phoma*, *Alternaria* и *Rhizoctonia* у однолетних растений, *Phoma* и *Lophodermium* – в более старших возрастных категориях. С увеличением возраста семян заметно повышается встречаемость микромицетов родов *Sclerophoma* и *Typhula*. Кладоспориоз (р. *Cladosporium*) и фомоз, вызываемый *Didymella* sp., чаще отмечались на больных сеянцах второго года жизни.

Учет числа питомников, в которых патогенные грибы выявлены на растениях определенного возраста, не противоречит полученным данным и позволяет добавить ризоктониоз к числу заболеваний, характерных для однолетних семян, альтернариоз – для двухлетних (рис. 5).

Таким образом, по данным молекулярно-генетической диагностики, основными болезнями 1–2-го года жизни семян в питомниках Красноярского края и Хакасии являются фомоз, альтернариоз, кладоспориоз и ризоктониоз, 3–6-го – фомоз, настоящее и обыкновенное шютте, склерофомоз, фацидиоз и выпревание семян.

Остальные болезни встречаются реже, не во всех питомниках и, скорее, относятся к категории случайных, появление которых чаще всего связано с нарушением технологии хранения семян и агротехники выращивания посадочного материала, ослаблением растений под воздействием неблагоприятных внешних факторов, если не существует микроклиматических и почвенных особенностей в зоне расположения питомника.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенные исследования показали, что фитосанитарный мониторинг лесных питомников с помощью ДНК-анализа является успешным методом выявления и определения заболеваний древесных пород и позволяет осуществлять фитопатологическую диагностику на высоком современном уровне. Весомое участие микроскопических грибов в патогенезе семян в питомниках Красноярского края и Хакасии указывает на необходимость пристального внимания к профилактике микозов со стороны практиков лесного питомнического хозяйства. Следует рекомендовать проведение профилактических обработок против указанных заболеваний фунгицидами, разрешенными к применению в лесном хозяйстве. Однако в настоящий момент в «Государственном каталоге пестицидов и агрохимикатов, разрешенных к применению на территории Российской Федерации» (2017), такие препараты отсутствуют, внедрения новых эффективных и экологически безопасных фунгицидов не происходит, что является серьезной проблемой современного лесовосстановления.

Авторы выражают благодарность отделу дистанционного лесопатологического мониторинга и геоинформационных систем Центра защиты леса Красноярского края за помощь в создании картографического материала.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Алимова Т. С., Сиволапов В. А., Карпеченко Н. А., Шишкина О. К., Пантелеев С. В., Ковалевич О. А. Применение методов молекулярной генетики для анализа наличия фитопатогенов в лесных насаждениях и питомниках Российской Федерации // Сиб. лесн. журн. 2014. № 4. С. 35–41.
- Баранов О. Ю. Молекулярная фитопатология: современные подходы и основные направления диагностики болезней древесных растений // Сиб. лесн. журн. 2014. № 4. С. 42–45.
- Баранов О. Ю., Ярмолович В. А., Пантелеев С. В., Куреев Д. Г. Молекулярно-генетическая диагностика грибных болезней в лесных питомниках // Лесн. и охотн. хоз-во. 2012. № 6. С. 21–29.
- Гаггаева Т. Ю., Ганнибал Ф. Б., Гаврилова О. П. Метод ПЦР-диагностики фитопатогенных грибов родов *Fusarium* и *Alternaria* // Вестн. защиты раст. Приложение. Высокопроизводительные и высокоточные технологии и методы фитосанитарного мониторинга. СПб.: ВНИИЗР РАСХН, 2009. С. 4–14.
- Государственный каталог пестицидов и агрохимикатов, разрешенных к применению на территории Российской Федерации. Ч. I. Пестициды. Изд. официальное. М.: Мин-во сельск. хоз-ва РФ, 2017. 970 с.

- Гродницкая И. Д., Кузнецова Г. В. Заболевания *Pinus sylvestris* L. и *Pinus sibirica* Du Roux в географических культурах и лесных питомниках Красноярского края и Хакасии // Хвойные бореальной зоны. 2012. Т. XXVII. № 3–4. С. 55–60.
- Громовых Т. И. Фитопатогенные микромицеты семян хвойных в Средней Сибири: видовой состав, экология, биологический контроль: автореф. дис. ... д-ра биол. наук: 03.00.24. М.: МГУ им. М. В. Ломоносова, 2002. 31 с.
- Громовых Т. И., Гукасян В. М., Малиновский А. Л., Тюльпанова В. А., Голованова Т. И. Использование микробного антагонизма в борьбе с инфекционным полеганием семян хвойных // Сиб. экол. журн. 1997. Т. 4. № 5. С. 501–504.
- Громовых Т. И., Литовка Ю. А., Андреева О. Н. Биологический контроль болезней семян хвойных в лесных питомниках Средней Сибири. Красноярск: СибГТУ, 2005. 264 с.
- Коссинская И. С. Фацидиоз сосны. Новосибирск: Наука. Сиб. отд-ние, 1974. 91 с.
- Кузьмичев Е. П., Соколова Э. С., Мозолевская Е. Г. Болезни древесных растений: справочник [Болезни и вредители в лесах России. Т. 1]. М.: ВНИИЛМ, 2004. 120 с.
- Министерство природных ресурсов и экологии Российской Федерации. Приказ от 18 августа 2014 г. № 367 «Об утверждении Перечня лесорастительных зон Российской Федерации и Перечня лесных районов Российской Федерации (с изменениями на 21 марта 2016 г.)». М.: Мин-во природ. рес. и экол. РФ, 2016.
- Мухина М. А., Антропова А. Б., Мокеева В. Л., Биланенко Е. Н., Чекунова Л. Н., Желтикова Т. М. Микромицеты пыльцы березы повислой, лещины обыкновенной и ежи сборной // Микол. фитопатол. 2014. Т. 48. № 5. С. 299–308.
- Падутов В. Е., Баранов О. Ю., Воропаев Е. В. Методы молекулярно-генетического анализа. Минск: Юнипол, 2007. 176 с.
- Семенкова И. Г., Соколова Э. С. Лесная фитопатология: учебн. для вузов. М.: Экология, 1992. 352 с.
- Сенашова В. А. Болезни хвои, вызванные фитопатогенными грибами, в Средней Сибири // Изв. СПб. лесотехн. акад. 2012. № 200. С. 275–284.
- Сенашова В. А., Анискина А. А., Полякова Г. Г. Фитопатогенные грибы филлосферы хвойных на территории Средней Сибири // Проблемы лесной фитопатологии и микологии: мат-лы I Междунар. конф., посв. 90-летию со дня рожд. проф. Н. И. Федорова, 19–24 октября 2015 г. Минск – Москва – Петрозаводск / Под ред. В. Г. Стороженко, В. Б. Звягинцева. Минск: БГТУ, 2015. С. 187–189.
- Соколова Э. С. Экология склерофомоза в культурах сосны // Лесоведение. 1984. № 4. С. 82–85.
- Шилкина Е. А., Раздорожная Т. Ю., Шеллер М. А. Результаты сравнительной диагностики фитопатогенов в лесопитомниках Красноярского края // Интенсификация лесного хозяйства России: проблемы и инновационные пути решения. Мат-лы Всерос. науч.-практ. конф. с междунар. участ. Красноярск, 19–23 сентября 2016 г. Красноярск: ИЛ СО РАН, 2016. С. 227–228.
- Шилкина Е. А., Шеллер М. А. Грибы рода *Typhula* в лесопитомниках Красноярского края // Сохранение лесных экосистем: проблемы и пути их решения: мат-лы Всерос. науч.-практ. конф., Киров, 15–19 мая 2017 г. / Под ред. Н. П. Савиных, О. Н. Пересторониной, Е. А. Домниной, С. В. Шабалкиной, М. Н. Шаклеиной. Киров: Изд-во «Радуга-ПРЕСС», 2017. С. 133–137.
- Якименко Е. Е. Микромицеты почв лесных питомников и их роль в патогенезе семян хвойных: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.16. Красноярск: Ин-т леса им. В. Н. Сукачева СО РАН, 1994. 20 с.
- Якименко Е. Е., Гродницкая И. Д. Инфекционное полегание семян хвойных в лесных питомниках Красноярского края // Микол. фитопатол. 1996. Т. 30. № 2. С. 56–60.
- Aveskamp M. M., De Gruyter J., Crous P. W. Biology and recent developments in the systematics of *Phoma*, a complex genus of major quarantine significance // Fungal Diversity. 2008. V. 31. P. 1–18.
- Golzar H., Lanoiselet V., Wang C., Tan Y. P., Shivas R. G. First report of *Phoma multirostrata* in Australia // Australasian Plant Disease Notes. 2015. V. 10. Iss. 1. Article: 8. 2 p.
- Index Fungorum, 2017.
- Ndobe E. N. Fungi associated with roots of healthy-looking Scots pines and Norway spruce seedlings grown in nine Swedish forest nurseries. Degree project – 30 credits – Advanced level. Dpt. For. Mycol. Plant Pathol., Swedish Univ. Agr. Sci., Uppsala, Sweden, 2012. P. 8.
- The National Center for Biotechnology Information – NCBI, 2017.
- White T. J., Bruns T., Lee S., Taylor J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics // M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White (Eds.). PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. San Diego: Acad. Press, 1990. P. 315–322.
- Yakimenko E. E., Grodnitskaya I. D. Effect of *Trichoderma* fungi on soil micromycetes that cause infectious conifer seedling lodging in Siberian tree nurseries // Microbiology. 2000. V. 69. Iss. 6. P. 726–729.
- Zimowska B. Characteristics and occurrence of *Phoma* spp. on herbs from the family Lamiaceae // Acta Scientiarum Polonorum Hortorum Cultus. 2011. Iss. 10. N. 2. P. 213–224.

DNA DIAGNOSTIC RESULTS OF FOREST NURSERIES PHYTOPATHOGENIC FUNGI OF KRASNOYARSK KRAI AND THE REPUBLIC OF KHAKASSIA

E. A. Shilkina, M. A. Sheller, T. Yu. Razdorozhnaya, A. A. Ibe

Russian Centre for Forest Protection, Center for Forest Protection of Krasnoyarsk Krai
Akademgorodok, 50a/2, Krasnoyarsk, 660036 Russian Federation

E-mail: krasgenles@mail.ru, maralexsheller@mail.ru, yuschkova.tatiana@yandex.ru, aaibis@mail.ru

The DNA-diagnostic results of phytopathogens in 26 forest nurseries of Krasnoyarsk Krai and the Republic of Khakassia in the period from 2014 to 2016 were presented. The objects of research were the plants of conifer species *Pinus sylvestris* L., *Pinus sibirica* Du Tour and *Picea obovata* Ledeb. aged from 1 to 6 years. According to the data of molecular genetic analysis in the forest nurseries of the studied areas, the representatives of 13 genera of pathogenic and conditionally pathogenic fungi that cause diseases of conifers were revealed: *Phoma* Sacc., *Didymella* Sacc., *Alternaria* Nees, *Cladosporium* Link, *Rhizoctonia* DC., *Lophodermium* Chevall., *Gremmenia* Korf. (*Phacidium* Fr.), *Sclerophoma* Höhn. (teleomorph – *Sydowia* Bres.), *Typhula* (Pers.) Fr., *Botrytis* P. Micheli ex Pers., *Gremmeniella* M. Morelet (*Scleroderris* (Fr.) Bonord.), *Septorioides* Quaedvl., Verkley & Crous and *Epicoccum* Link. Seven genera of micromycetes are found in all three surveyed forest zones: taiga, forest-steppe and Southern-Siberian mountain. The most frequently occurred lesions were caused by the sac fungi. Some of the identified diseases practically had not been diagnosed before. In each of the nurseries, the pathogenic microflora was represented by 1–7 species of microscopic fungi, several pathogens were often presented simultaneously on the infected seedlings. In the process of working, the dominant pathogens, connection of pathogens with certain species and with the seedlings age composition have been identified. Such diseases as *Phoma* blight and *Lophodermium* needle cast predominated the frequency of occurrence, their relative abundance was 30 % and 28 % respectively of all identified fungal infections of plants. Also, given the climatic conditions of the region, attention should be paid to the phytopathogens – *Gremmenia infestans* (P. Karst.) Crous and *Typhula* sp.

Keywords: forestry, forest nurseries, phytopathogens, phytopathological monitoring, DNA-analysis, coniferous, diseases diagnostics.

How to cite: Shilkina E. A., Sheller M. A., Razdorozhnaya T. Y., Ibe A. A. DNA diagnostic results of forest nurseries phytopathogenic fungi of Krasnoyarsk Krai and the Republic of Khakassia // *Sibirskij Lesnoj Zhurnal* (Sib. J. For. Sci.). 2018. N. 2. P. 15–27 (in Russian with English abstract).