ИДЕНТИФИКАЦИЯ КОРНЕВОЙ ГУБКИ (*HETEROBASIDION ANNOSUM* (FR.) BREF S.L.) В ДРЕВОСТОЯХ СОСНЫ ОБЫКНОВЕННОЙ АЛТАЙСКОГО КРАЯ МЕТОДАМИ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОГО АНАЛИЗА

Шуваев Д.Н., Кальченко Л.И., Дергачев В.И.

Филиал ФБУ «Рослесозащита» - «ЦЗЛ Алтайского края», Россия, <denis.shuvaev@gmail.com>

Из всего спектра патогенов, атакующих древесные породы, корневая губка относится к числу наиболее распространенных и вредоносных возбудителей болезней лесных насаждений. Данный вид вызывает пеструю ситовую гниль корней хвойных. Гнили корней хвойных пород во многих странах мира принимают характер энфитотий и наносят огромный ущерб. Эта болезнь хвойных является одной из наиболее разрушительных в северном полушарии. Она приводит к массовому усыханию деревьев и распаду насаждений, что наносит значительный ущерб лесному хозяйству. Связанные с данным патогеном, экономические потери для Европы, оцениваются в 800 млн. евро в год. Для лесной отрасли РФ расчеты экономического ущерба, связанного непосредственно с корневой губкой, вероятно, сильно занижены, поскольку для данного патогена характерна скрытность проявления заболевания. Из вышеизложенного следует, что существует потребность в методе быстрого и точного определения инфекции корневой губки в естественных и искусственных насаждениях для ранней локализации очагов и принятия дальнейших мер по предупреждению развития инфекции.

В настоящее время методы молекулярно-генетической идентификации видов, основанные на применении видоспецифических маркеров, относительно легкодоступны для большинства генетических лабораторий. Маркерные регионы геномов, характеризующие определенный вид или род, как правило, хорошо изучены и часто не требуют затрат на проведение дополнительных исследований. В данной работе мы преследовали цель апробации метода молекулярно-генетической диагностики корневой губки в естественных и искусственных древостоях сосны обыкновенной.

Материалом для исследований послужили корни усыхающих и визуально здоровых деревьев сосны обыкновенной, а также плодовые тела корневой губки. Каждый образец корня высверливали в различных 4-5 местах, избегая просмоленных участков, формируя таким образом комплексный образец из древесной стружки одного корня. Экстракцию ДНК проводили согласно стандартному CTAB-методу. В качестве основы для реакционной смеси ПЦР был использован готовый набор ScreenMix-HS производства ЗАО Евроген. Объем ПЦР-смеси составил 20мкл. Конечные концентрации праймеров составили 0,16 пкМоль/мкл. Режим амплификации: 950C - 5мин; (950C - 15 сек, 620C - 20 сек, 720C - 1 мин)\*32; 720C - 3 мин; 40C - ∞. Электрофоретическое разделение продуктов амплификации проводили в горизонтальных камерах Helicon "SE-2" в 1-кратном ТБЕ-буфере в 1%-м агарозном геле. Амплифицированный генетический материал визуализировали посредством окраски геля в растворе бромистого этидия с последующей проявкой на трансиллюминаторе.

Всего было обследовано 46 деревьев сосны обыкновенной из 10 лесничеств Алтайского края. Из них генетический материал корневой губки был обнаружен в образцах корней 12 деревьев 3-х лесничеств и дополнительно 2-х лесничеств, где были обнаружены плодовые тела грибов, но в корнях ДНК грибов не была обнаружена. Точки, где был отмечен генетический материал патогенна, были нанесены на карту и станут отправными для дальнейшей детальной локализации очагов инфекции.

IDENTIFICATION OF *HETEROBASIDION ANNOSUM* (FR.) BREF S.L. IN THE STAND OF TREES OF SCOTS PINE IN ALTAY REGION BY METHODS OF DNA-ANALYSIS

Shuvaev D. N., Kalchenko L. I., Dergachev V. I.

Branch of the Russian Centre for Forest Protection

Centre for Forest Protection of Altai Territory, Russia, <denis.shuvaev@gmail.com>

*Heterobasidion annosum* is one of the most dangerous and widespread diseases attacking conifers in the temperate and boreal regions of the Northern Hemisphere. This species causes root and butt rot of conifers. The root rots of conifer trees cause great damage in many countries of the world and they may be characterized as enphytoties. Financial losses caused by the species complex of *Heterobasidion* in the European Union were estimated at 800 million euro per year. For forest management of Russian Federation the estimates of economic losses directly caused by *Heterobasidion annosum* probably severely understated, since the pathogen is characterized the hidden form of disease. Therefore, there is the need for fast and precise method of identification *Heterobasidion annosum* in the natural stands and the forest plantations for early localization of pest holes and adoption of further actions that to prevent spreading of infections.

Currently the methods of molecule-genetic identifications of species based by the use species-specific markers became relatively easy available for many of genetic laboratories. The marker regions of genomes characterized definite species or genera usually are studied well and they often are not required costs for additional studies. In this work we aimed goal examining of DNA-diagnostic method of *Heterobasidion annosum* in the natural stands and the forest plantations of Scots pine.

Plant material was presented the roots of dying and visually healthy trees of Scots pine as well as fruit bodies of *Heterobasidion annosum*. Each sample of root was drilled in different four or five spots avoiding resinous sectors after we mixed all the shavings from the single root and obtained the complex sample. Extraction of DNA was conducted in accordance with standard CTAB-protocol. Aliquots of 4 µl of the reaction mix (ScreenMix-HS) were combined with 13,6 µl ddH2O and 0,8 µl each of primers (final concentrations - 0,16 µm). Temperature cycling was carried out using a programmable heat block (ABI Prism Thermal Cycler 9700). An initial denaturation step of 950C for five minutes was followed by 32 amplification cycles of denaturation, annealing, and extension. The temperature and times for these steps in the first step was 950C for 15 s, 620C for 20 s, and 720C for 1 minute. After the 32 cycles were completed, the samples were incubated an additional 3 min at 720C. PCR products were electrophoresed in horizontal cells (Helicon, SE-2) in 1% agarose gel with standard TBE-buffer solution. The gels were exposed in solution of ethidium bromide for 20 min and visualized in UV-radiation.

Overall was observed 46 trees of Scots pine from 10 forestry of Altai territory. The genetic material of *Heterobasidion* was found in roots of 12 trees growing in 3 forestry and additionally 2 forestry where were found fruit bodies of the fungi, but in the roots DNA of *Heterobasidion* was not detected. These sites, where the genetic material of pathogen was marked, were mapped and would become the initial sites for further detail localization of pest holes.