

- материалы международного научно-практического семинара. Минск: Право и экономика, 2009. С. 156–158.
2. *Фасулати К. К.* Полевое изучение наземных беспозвоночных: учебн. пособие для университетов. Москва: «Высшая школа», 1971.
  3. *Лопатин И. К.* Насекомые Беларуси: листоеды (Coleoptera, Chrysomelidae): монография. Минск: Технопринт, 2005.
  4. *Нестерова О. Л.* Трофическая специализация жуков-листоедов (Coleoptera, Chrysomelidae) фауны Беларуси // Вестник БГУ. Сер. 2: Хим. Биол. Геогр. 2003. № 1. С. 104–106.

## **ИДЕНТИФИКАЦИЯ ВОЗБУДИТЕЛЯ ПАРШИ, ВЫДЕЛЕННОГО С ВОСПРИИМЧИВЫХ СОРТОВ ГРУШИ ЕВРОПЕЙСКОЙ (PYRUS COMMUNIS L.VAR SATIVA DE CONDALE), НА ОСНОВЕ АНАЛИЗА РДНК**

**С. Ю. Трофимович**

### **ВВЕДЕНИЕ**

Парша – одно из наиболее распространенных заболеваний яблони и груши в мире, а также в Республике Беларусь. Это заболевание вызывается грибами *Venturia inaequalis* и *V. pirina*. Исследования этого фитопатогена на молекулярно-генетическом уровне в нашей стране не проводятся. Парша поражает плоды, листья и побеги, что приводит к снижению устойчивости деревьев к низким температурам. В результате поражения на листьях и плодах появляются темно-оливковые, впоследствии черные пятна. Сильно пораженные листья преждевременно усыхают и опадают. Плоды принимают неправильную форму, становятся мало пригодным в пищу с пониженным содержанием витаминов [1]. *Venturia* – это род грибов аскомицетов, в жизненном цикле которых выделяют половую (аскоспоры) и бесполоую (конидиальную) стадии, из которых бесполовая стадия является преобладающей. Чередование половой и бесполой стадий развития является источником гетерогенности популяции, а также позволяет адаптироваться к изменениям условий среды.

Идентификация возбудителя заболевания является очень важной при выборе мероприятий по защите растений. При изучении таксономических особенностей, большое внимание уделено культуральным и морфологическим признакам, однако, во многих работах отмечается субъективность оценки [2].

Цель данной работы: идентифицировать возбудителя парши, выделенного из очагов поражения восприимчивых сортов груши европейской, на основе анализа рДНК.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследований служили изоляты грибов, выделенные из очагов поражения листьев и плодов растений восприимчивых сортов груши европейской (*Pyrus communis L. var. Sativa DC.*) – Мраморная, Белорусская поздняя, Сладкая из Млиева. Они были предоставлены лабораторией кафедры фитопатологии и химической защиты растений УО «Гродненский Государственный Аграрный Университет». Для выявления вида грибных фитопатогенов в данной работе проводился анализ рДНК с использованием молекулярно-генетических методов (SSCP, PCR-RFLP).

ПЦР проводилась с помощью амплификатора GeneAMP PCR System 2007 Applied Biosystems. Реакцию проводили в общем объеме 15 мкл, содержащем: 7x ПЦР буфер, 2 mM dNTP, ДНК, Taq полимеразы (5 ед/мкл), H<sub>2</sub>O. При постановке ПЦР использовались праймеры: ITS1-F (5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3') и ITS2 (5'-GCTGCGTTCTTCATCGATGC-3')[4].

Условия амплификации были следующие: 1 цикл продолжительностью 2 мин при температуре 94 °С; 30 циклов, включающих 30 сек при 94 °С, 1 мин при 54 °С, 1 мин при 72 °С; 1 цикл продолжительностью 5 мин при 72 °С.

Амплифицированные продукты анализировали с помощью электрофореза в 0,9% агарозном геле и 1x TAE-буфере.

Реакцию с *BsH1236I* проводили при температуре 37° С в течение 4 часов.

Одноцепочечный конформационный полиморфизм: 4 мкл ПЦР продукта смешивали с 4 мкл загрузочного буфера (50% сахара, 6 mM ЭДТА, 0,25% бромфеноловый синий), инкубировали в течение 5 мин при 95 °С и сразу же охлаждали на водно-ледяной бане.

Электрофоретическое разделение фрагментов ДНК проводили в полиакриламидном геле при 20 мА в течение 20 мин. Окрашивание геля осуществляли бромистым этидием (5 мкг/мл) в течение 20 минут в темноте.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Принимая во внимание источник выделения, весьма вероятно, что выделенные изоляты относятся к виду *V. pirina*, вызывающему паршу груши. Однако, согласно культурально-морфологическим признакам, которые были неустойчивы и значительно варьировали в зависимости от условий культивирования, нельзя сделать окончательный вывод о принадлежности грибов к виду *V. pirina*. Кроме того, в совокупности куль-

турально-морфологические методы идентификации возбудителя достаточно громоздки и длительны, недостаточно точны и зависят от условий проведения анализа, что в целом затрудняет работу исследователей.

Учитывая близость расположения садов груши и яблони, было предположено, что анализируемые изоляты могут принадлежать как к виду *V. pirina*, так и *V. inaequalis*, вызывающему паршу яблони. Поэтому в качестве контролей использовались изоляты данных видов с характерными признаками.

В качестве анализируемой области рДНК был использован внутренний транскрибируемый спейсерный участок ITS1. Как известно из литературных данных, ITS1 участки эволюционируют быстрее, чем кодирующие и могут варьировать среди видов и популяций.

С использованием праймеров ITS1-F и ITS2, которые амплифицируют участок рДНК от 3-конца гена 18s рРНК до 5-конца гена 28s рРНК, был получен ампликон размером около 250 п.н. как с рДНК анализируемых изолятов, так и контрольных образцов.

При амплификации рДНК у видов *Venturia*, выделенных из мировых коллекций ампликон был размером 270 п.н и 660 п.н. [3].

Принимая во внимание полученный размер ампликона анализируемых изолятов, можно заключить, что они характеризуются отсутствием интрона в данном участке рДНК. Таким образом полученные данные не позволяют идентифицировать исследуемые образцы. Однако не исключается их принадлежность к виду *Venturia inaequalis*.

Полученные ПЦР-продукты были денатурированы нагреванием и подвергнуты электрофорезу в полиакриламидном геле. Качественный анализ с помощью SSCP показал вероятную принадлежность образцов 1, 3–15 к *V. inaequalis*. В то время как паттерны образца 2 аналогичны контролям *V. pirina* (рис. 1).

Для подтверждения полученных результатов, проводился анализ с использованием метода PCR-RFLP.

Как видно из рисунка 2, сайт, распознаваем рестриктазой *Bsh1236I* имеется у референсного образца *Venturia pirina* и анализируемого образца 2. Принимая во внимание, что размер ампликона рДНК *V. inaequalis* и остальных образцов после рестрикции остался неизменным, он составил – 250 п.н, можно заключить, что они не содержат сайта распознаваемого *Bsh1236I* (рис. 2).

Результаты анализа ампликонов участка ITS1 рДНК, полученные с использованием метода SSCP, согласуются с результатами PCR-RFLP анализа и косвенно указывают на то, что нуклеотидная последователь-

ность области ITS1 образца 2 аналогична контролю *V. pirina*, образцов 1, 3–15 – *V. inaequalis*.

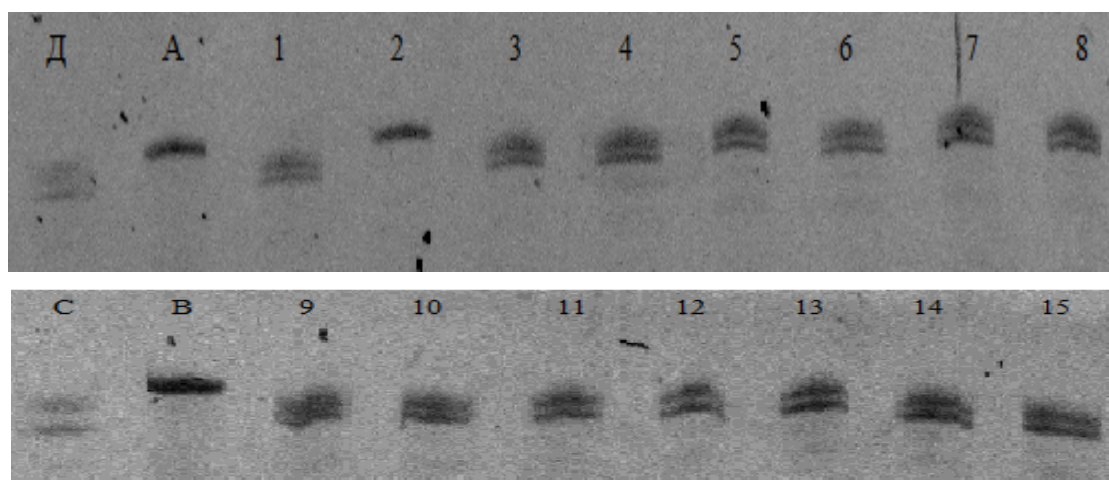


Рис. 1. SSCP анализ ITS1 участка рДНК анализируемых образцов (1–15) и контролей: *V. pirina* – А, В, *V. inaequalis* – Д, С. М – маркерная ДНК

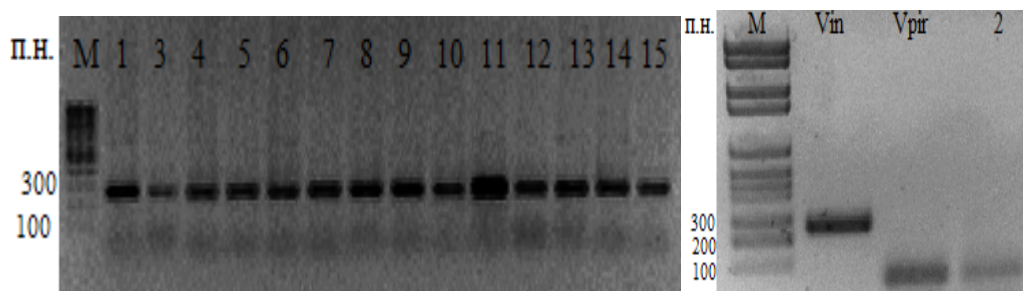


Рис. 2. Электрофореграмма ПЦР продуктов, обработанных рестриктазой *Bsh1236I*. М – маркерная ДНК

Полученные результаты исследования показывают, что на вегетирующей груше способна развиваться парша яблони. Весьма вероятно, что *V. inaequalis* сапротрофно колонизирует очаги поражения, первоначально образованные специализированным для груши патогеном *V. pirina*.

### Литература

1. Bénéouf G., Parisi L. Genetics of host-pathogen relationships between *Venturia inaequalis* races 6 and 7 and *Malus* species // *Phytopathology*. 2000. Vol. 90(3). P. 236–242.
2. Le Cam B., Devaux M., Parisi L. Specific polymerase chain reaction identification of *Venturia nashicola* using internally transcribed spacer region in the ribosomal DNA // *Phytopathology*. – 2001. Vol. 91. P. 900–904.
3. Schnabel G., Schnabel E. L., Jones A. L. Characterization of ribosomal DNA from *Venturia inaequalis* and its phylogenetic relationship to rDNA from other tree-fruit *Venturia* species // *Phytopathology*. 1999. Vol. 89. P. 100–108.
4. Stehmann C., Pennycook S., M.Plummer K. Molecular identification of a sexual interloper: the pear pathogen, *Venturia pirina*, has sex on apple // *Phytopathology*. 2001. Vol. 91. P. 633–641.