УДК 577.212:632.4

БАРАНОВ О.Ю., *к.б.н., ведущий научный сотрудник ГНУ «Институт леса НАН Беларуси»*

ЯРМОЛОВИЧ В.А., *к.б.н., доцент ВГТУ*

ПАНТЕЛЕЕВ С.В., *магистр, аспирант ГНУ «Институт леса НАН Беларуси»*

КУПРЕЕНКО Д.Г., *инженер ГНУ «Институт леса НАН Беларуси»*

16.05.2012 г.

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА ГРИБНЫХ БОЛЕЗНЕЙ В ЛЕСНЫХ ПИТОМНИКАХ

РЕФЕРАТ

В статье представлены результаты исследования авторов по определению видового состава возбудителей заболеваний посадочного материала в лесных питомниках на основании использования методов ДНК-маркирования. В ходе проведенного молекулярно-фитопатологического анализа идентифицировано 44 вида патогенных микромицетов. Показана доминирующая роль представителей родов *Phoma, Cladosporium, Alternaria* и *Epicoccum* в формировании заболеваний сеянцев и саженцев. Предложены рекомендации по профилактике и лечению выявленных заболеваний. Продемонстрированы преимущества методов молекулярно-генетического анализа при проведении ранней диагностики и идентификации заболеваний посадочного материала в лесных питомниках.

SUMMARY

The paper presents the results of phytopathogenic species determination in forest nurseries, based on the utilization of DNAassays. In the course of molecular phytopathological research 44 species of pathogenic micromycetes were identified. It is shown that the dominant role of the formation seedlings and saplings infection is belonging to the genera *Phoma, Cladosporium, Alternaria,* and *Epicoccum.* Recommendations for prevention and treatment of identified diseases are presented. Showed that molecular genetic markers are a useful tool for diagnosis and species identification of fungal infections in forest nurseries.

ВВЕДЕНИЕ

Одной из основных проблем, связанных с выращиванием посадочного материала в лесных питомниках является наличие инфекционных болезней растений, вызываемых различными патогенными микроорганизмами: грибами, реже бактериями и вирусами. Зачастую возникновение и развитие заболеваний связано с первичным ослаблением и снижением устойчивости сеянцев и саженцев вследствие длительного неблагоприятного воздействия метеорологических факторов (засуха, заморозки и др.) или нарушения агротехники выращивания. Также немаловажным является и использование зараженных семян или почвенных субстратов [1].

Мероприятия по защите сеянцев и саженцев древесных пород от болезней представляют собой использование целого комплекса агротехнических, биологических, химических, физико-механических и других методов. При этом лесопатологическому мониторингу и профилактическим мероприятиям отводится ключевая роль, что связано, в первую очередь, с экономической целесообразностью предупреждения развития болезней по сравнению с организацией и проведением мероприятий по оздоровлению посадочного материала [2].

Основой фитопатологического анализа в полевых условиях является макроскопический метод - диагностика болезней по внешним признакам ослабления/повреждения растений на основе прямой визуальной оценки. По состоянию и анатомо-морфологическим изменениям растений, особенностям проявления симптомов часто удается определить только тип болезни (шютте, ржавчину или пятнистость листьев, инфекционное полегание сеянцев, корневую гниль и др.), без установления точных причин ее возникновения и идентификации возбудителя заболевания. Для более достоверной диагностики заболеваний выполняют микроскопирование пораженных тканей с целью обнаружения патогенного микроорганизма и его идентификации по структуре мицелия и плодовых тел, особенностям спороношения. Микроскопический метод является наиболее распространенным в практике специализированных лабораторий лесозащитных организаций. В случае затруднения прямой микроскопической диагностики болезней данный метод дополняют микологическим - пересевом фитопатогенных организмов из растительных тканей на специальные искусственные питательные среды - создание культур изолятов *in vitro.* Недостатками исследования фитопатогенов путем пересева инфекционного начала в чистую культуру являются длительность исследований, их трудоемкость и отсутствие специфических сред для каждого конкретного вида возбудителя болезни. Следует также отметить, что некоторые виды

облигатных паразитов не способны произрастать в искусственных условиях или требуют для роста многокомпонентные селективные среды, сложные в приготовлении. Кроме того, некоторые грибные организмы в культуре могут терять стадию полового процесса, что делает данные культуры непригодными для видовой идентификации. Особые требования предъявляются также к уровню квалификации пёрсонала, проводящего культивирование и определение микроорганизмов [3].

На текущий момент наиболее современными и перспективными способами диагностики и видовой идентификации болезнетворных микроорганизмов являются методы, основанные на применении технологий молекулярной генетики. Общие принципы диагностики возбудителей инфекционных заболеваний сводятся к выявлению генетического материала патогена в тканях хозяина или образцах почвы, воды, воздуха, соскобах, пыли и др. с помощью специфических реактивов и оборудования [4].

В настоящее время на диагностическом рынке имеется большое количество наборов, предназначенных в основном для генетической идентификации инфекционных болезней человека и сельскохозяйственных животных. Коммерческие наборы для анализа возбудителей болезней растений представлены в меньшей степени, и их основной перечень ориентирован на выявление патогенов сельскохозяйственных культур. В то же время диагностические исследования заболеваний лесных древесных видов зачастую проводятся только специализированными лабораториями научно-исследовательских и образовательных учреждений на основе разработанных оригинальных или представленных в литературе методик.

На базе лаборатории генетики и биотехнологии Института леса НАН Беларуси разработана технология ранней диагностики возбудителей грибных и бактериальных заболеваний лесных древесных видов. В рамках Государственной научно-технической программы «Леса Беларуси:продуктивность, устойчивость, эффективное использование» проводится фитопатологическое обследование лесных питомников на основании использования методов ДНК-маркирования и внедрение технологии ранней диагностики и идентификации болезней древесных растений в лесохозяйственную практику.

Целью данной работы явилась молекулярно-генетическая диагностика и установление видового состава фитопатогенных грибов, вызывающих болезни посадочного материала в лесных питомниках.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Экспериментальный материал для анализа был непосредственно собран в лесных питомниках или предоставлен лесопатологической службой лесхозов Гомельского, Минского, Могилевского, Гродненского и Брестского ГПЛХО. Для фитопатологической диагностики были отобраны фрагменты вегетативных органов одно- и трехлетнего посадочного материала восьми древесных пород (сосны, ели, лиственницы, пихты, туи, дуба, клена, липы, березы) с признаками инфекционного поражения. Общее число образцов составило 630 шт. Образцы фиксировались в 70% спирте и хранились при -20°С. Дополнительный экспериментальный материал был представлен 60 образцами почвы.

Процедура молекулярно-фитопатологической диагностики состояла из следующих стадий, представленных на Рисунке 1: выделение суммарной ДНК из инфицированных растений, амплификация локусов грибной ДНК методом ПЦР, расшифровка структуры амплифицированных локусов (секвенирование), сравнительный анализ в базе данных (идентификация).

Выделение суммарной ДНК из растительного материала, растительных остатков было выполнено CTAB-методом, почвы - PEG-методом [5]. Для установления видовой принадлежности изолятов была проведена амплификация и секвенирование региона рДНК, включающего следующую последовательность

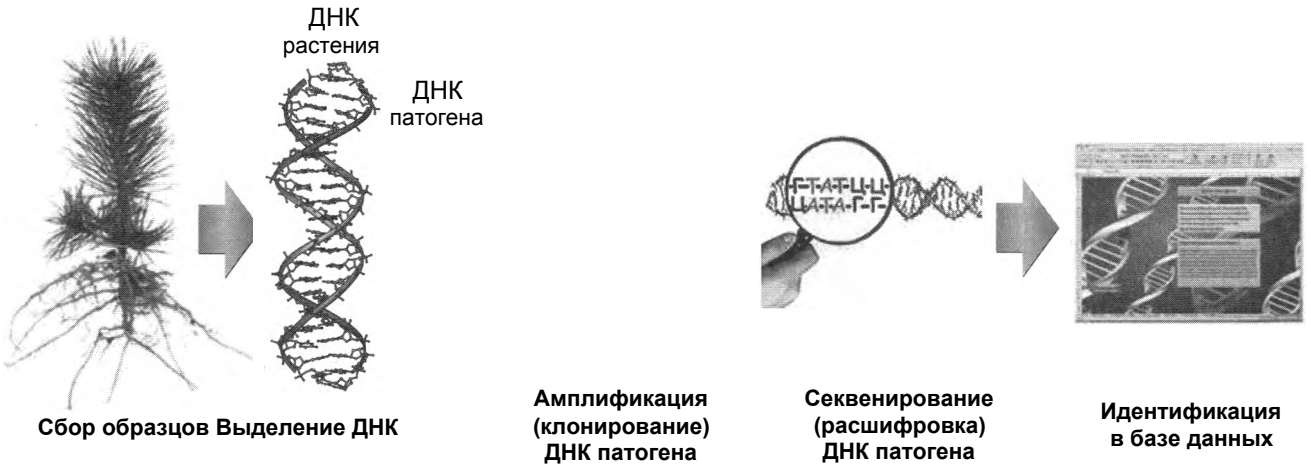


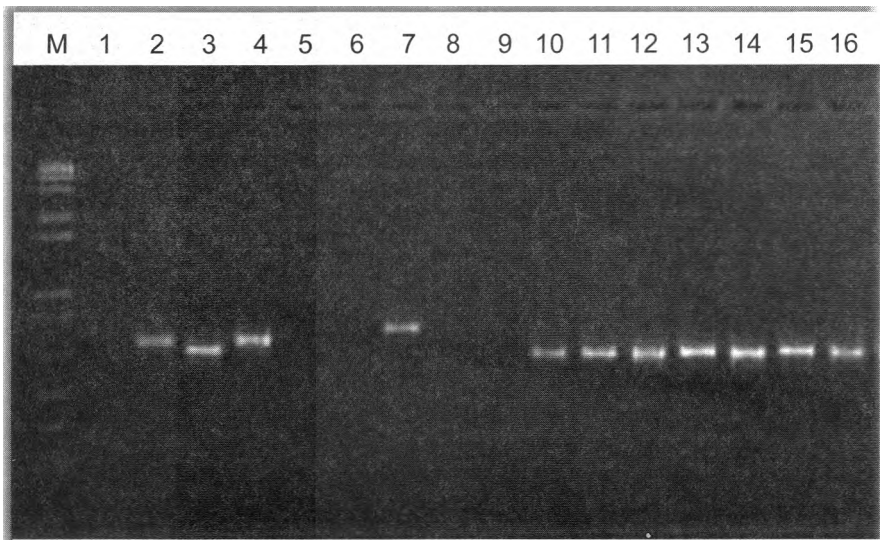
Рисунок 1. Схема проведения молекулярно-генетической диагностики патогенов в лесном посадочном материале

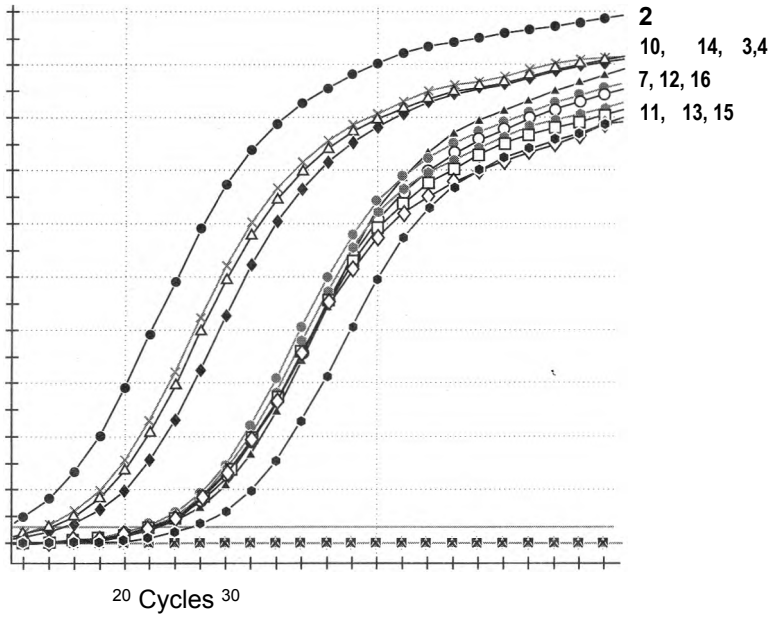
локусов: 18S рРНК - ВТС1 - 5,8S рРНК - ВТС2 - 28S рРНК. ПЦР-анализ был выполнен на основании использования DreamTaq™ Green PCR Master Mix (Fermentas, Литва) при следующих параметрах реакции: начальная денатурация - 5 мин при 95°С, последующие 35 циклов - 20 сек. при 95°С, 25 секунд при 67°С и 45 секунд при 72°С, финальная элонгация - 8 мин при 72°С. Для амплификации были использованы праймеры ITS1 и ITS4 [6]. Предварительный анализ продуктов амплификации был выполнен с помощью электрофоретического фракционирования в 2,5% агарозном геле с последующим окрашиванием бромистым этидием, а также дополнительным рестрикционным анализом [5]. Альтернативные по размеру и рестрикционным спектрам (Mspl, Alul, Taql, Rsal, Hhal) ампликоны отобраны для последующего секвенирования. Секвенирующая реакция была выполнена на основании использования набора BigDye Terminator Sequence Kit v.1.1 (Applied Biosystems, США) согласно протоколу компании-изготовителя. Электрофоретическое фракционирование проведено с помощью генетического анализатора ABI Prism 310 (Applied Biosystems, США), интерпретация результатов - программного обеспечения Sequence Analysis 5.1.1 (Applied Biosystems, США). Для установления (подтверждения) видовой принадлежности образцов, нуклеотидная структура секвенированных ампликонов была проанализирована с помощью программы BLAST в GenBank NCBI [7].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе проведенной молекулярно-генетической диагностики посадочного материала в инфицированных растениях было выявлено наличие генетического материала патогенов. В случае электрофоретического анализа ПЦР-продуктов, образцы инфицированных растений хвойных пород на фореграммах были представлены окрашенными зонами - выявляемый генетический материал патогенных микромицетов, в то же время здоровые растения характеризовались отсутствием ДНК возбудителей заболеваний (рисунок 2) [8]. При использовании технологии ПЦР в реальном времени у зараженных растений в ходе прохождения программы амплификации наблюдалось накопление ПЦР-продукта (наличие S-образной кинетической кривой), у здоровых образцов график амплификации являлся горизонтальным, а уровень сигнала находился в пределах уровня детекции фоновых значений (рисунок 2) [5].

ДНК-спектры посадочного материала лиственных пород (дуба, клена, липы, березы), кроме генетического материала патогена в случае инфицированных растений, содержали и ампликоны растения-хозяина, что связано с гомологией регио-



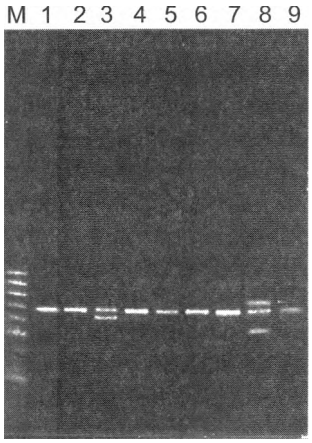


б)

М - электрофоретический стандарт, 1, 5, 6, 8, 9 - здоровые растения, 2-4, 7,10-16 - инфицированные растения

Рисунок 2. Молекулярно-фитопатологическая диагностика посадочного материала хвойных методами а) классической ПЦР и б) ПЦР в реальном времени

нов генов 18S и 28S рРНК грибов и покрытосеменных растений (рисунок 3) [9]. Здоровые сеянцы и саженцы характеризовались наличием только одной окрашенной зоны, специфичной для исследуемой породы. Данная диагностическая особенность лиственных пород использовалась в качестве дополнительного внутреннего контроля протекания ПЦР-реакции. Отсутствие фракции растения-хозяина в ПЦР-спектре указывало на нарушение технологии молекулярно-фитопатологического анализа.



ДНК растения
(дуб черешчатый)

M - электрофоретический стандарт,
1, 2,4-7, 9 - здоровые растения,
3, 8 - инфицированные растения

Рисунок 3. Молекулярно-фитопатологическая диагностика посадочного материала лиственных пород

Таблица

Выявленный видовой состав патогенов хвойных пород на основе молекулярно-генетической диагностики

Лесхоз	Порода	Вид патогена
Пинский	сосна	*Phoma pomorum*
Быховский	ель сосна	*Sphaeropsis sapinea, Phoma pomorum, Alternaria sp., Aureobasidium pullulans* *Sclerophoma pithya, Aureobasidium pullulans*
Речицкий	сосна	*Phoma pomorum*
Белыничи	сосна	*Alternaria sp.*
Ивьевский	лиственница	*Meria laricis*
Могилев	ель туя сосна	*Cladosporium herbarum, Rhodotorula sp.* *Epiccocum nigrum* *Cladosporium sp.*
Слонимский	туя	*Cercospora kikuchii*
Ветковский	сосна	*Phoma macrostoma*
Новогрудский	ель пихта	*Phoma pomorum* *не имеющий таксономического описания вид гриба класса аскомицеты (идентифицирован впервые)*
Смолевичский	сосна ель	*Cladosporium herbarum* *Cladosporium herbarum, Cladosporium sp., Aureobasidium pullulans, Melampsora laricis*
Волковысский	туя	*Botrytis cinerea, Cladosporium herbarum, Sclerophoma pithya*
Горецкий	ель сосна	*Rhizosphaera kalkhoffii* *Sistotrema sp., Phoma herbarum*
Кореневская ЭЛБ	сосна	*Cladosporium herbarum, Alternaria alternata, Cryptococcus pinus, не имеющий таксономического описания вид гриба класса аскомицеты (NCBIGQ413953)*
Двинская ЭЛБ	ель сосна	*Cladosporium sp., Sporobolomyces sp. Alternaria sp., Phoma sp., Epicoccum nigrum* *Aureobasidium pullulans, Epicoccum nigrum*
Горецкий	ель	*Alternaria alternata*
Милошевичский	сосна	*Sphaeropsis sapinea, Phoma sp., Cladosporium sp.*
Вилейский (предоставлено ГУ «Беллесозащита»)		*Rhizoctonia solani, Cladosporium sp., Cladosporium cladosporides, Aureobasidium pullulans*
Калинковичский	сосна	*Sydowia polyspora, Rhizoctonia solani, Phoma macrostoma*
Светлогорский	сосна	*Phoma sp., Alternaria alternata*
Мозырский	сосна	*Phoma macrostoma*
Жлобинский	сосна	*Cladosporium sp.*
Октябрьский	сосна	*Phoma sp., Alternaria sp., Cladosporium cladosporioides, Epicoccum nigrum, Fusarium sp., Fusarium sporotrichioides*
Чаусский	ель	*Cladosporium sp., Alternaria sp., Cladosporium cladosporides, Cladosporium herbarum*

к,

Следует также отметить, что расположение фракций на электрофореграмме зависело от размера выявляемого фрагмента ДНК патогена и являлось величиной видоспецифичной. Данный признак использовался в качестве первичного критерия при проведении идентификации возбудителя заболевания [10].

В ходе обследования лесных питомников для большинства образцов инфицированных растительных тканей были получены многофракционные ПЦР-спектры, что свидетельствовало о содержании генетического материала более чем одного вида патогенов. Несмотря на многофракционный тип выявляемых спектров, наибольшей интенсивностью обычно характеризовался какой-либо один или несколько доминирующих альтернативных вариантов ампликонов, что указывало на большее количественное содержание соответствующего ему вида гриба в исследуемом образце (рисунок 4) [11].

На основании проведенного исследования 630 образцов пораженных растений и 60 образцов почвы из питомников лесхозов было выявлено 44 наиболее распространенных варианта ампликонов. Проведенное секвенирование и последующий анализ данных нуклеотидных последовательностей в Генном Банке NCBI позволил идентифицировать 44 различных вида грибов, относящихся к 23 родам отдела *Ascomycota.* Следует отметить, что спектр болезней, выявленных у лиственных пород, являлся типичным для условий Беларуси и был представлен: черной пятнистостью листьев клена (возбудитель *Rhytisma acerinum),* церкоспорозом липы (возбудитель *Cercospora microsora),* мучнистой росой березы (возбудитель *Microsphaera betula)* и мучнистой росой дуба (возбудитель *Microsphaera alphitoides)* [12]. В то же время для хвойных пород было выявлено значительное число заболеваний, характеризующихся сходной внешней симптоматикой, что делает визуальную диагностику затруднительной. При этом выявленные болезни различались по этиологии (вызываемым причинам), а также мерам профилактики и защиты. Видовой состав патогенов представлен в Таблице. Графическое отображение данных о частоте встречаемости основных болезней посадочного материала хвойных видов в изученных питомниках приведено на Рисунке 5.

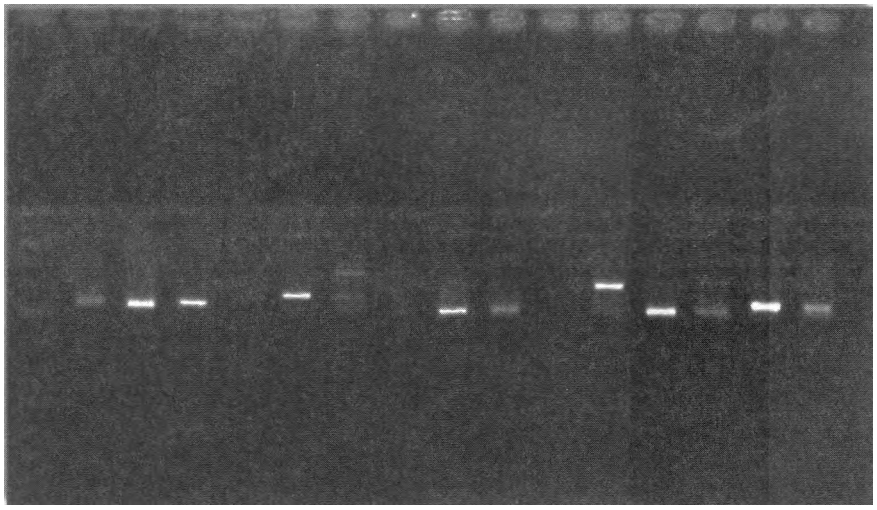


Рисунок 4. ПЦР-спектр патогенов саженцев ели европейской (Быховский лесхоз) |

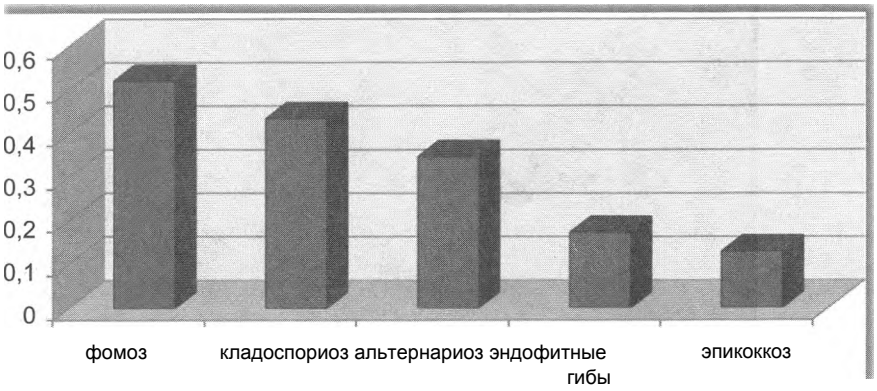


Рисунок 5. Встречаемость болезней посадочного материала хвойных видов в изученных питомниках (на основании данных молекулярно-генетической диагностики)

Как видно из таблицы и рисунка, в наибольшем числе случаев представлены заболевания, вызываемые некротрофными грибами родов *Phoma, Cladosporium, Alternaria* и *Epicoccum.* Внешнее проявление болезней, вызываемых данными грибами, сводится к пожелтению и усыханию хвои (шютте), что зачастую приводит к ошибочной постановке диагноза, как обыкновенное шютте сосны (вызывается грибом *Lophodermium pinastri)* или ели (вызывается грибом *Lirula macrospora)* при непосредственной визуальной оценке. Ниже приводится описание выявленных патогенов и вызываемых ими заболеваний посадочного материала.

Представители рода *Phoma* являются широко распространенными почвенными микромицетами, проявляющими патогенные свойства по отношению к широкому кругу сельскохозяйственных и лесных видов растений. В лесных питомниках *Phoma spp.* вызывает фомоз (сухую гниль) посадочного материала хвойных пород. Заражение растений данным патогеном происходит в основном в период переувлажненности почвы через

хвою, контактирующую с землей. Затем патоген распространяется вдоль по стеблю и вызывает гибель верхушечной почки растения (рисунок 6). На начальном этапе развития болезни преимущественно поражаются только ослабленные сеянцы и саженцы, в случае массовой вспышки патогена инфицированию подвергается также и здоровый посадочный материал [13].

Для ограничения вредоносности патогена, по литературным данным, наиболее эффективным является регулярная (каждые 2-4 недели) обработка вегетирующих сеянцев комплексом фунгицидных препаратов, содержащих хлороталонил или его аналоги. Вследствие того что виды *Phoma* являются возбудителем заболеваний многих пропашных культур (например патоген кукурузы *Ph. potogum),* не рекомендуется выращивание посадочного материала или создание лесных культур на данных типах сельскохозяйственных земель без проведения предварительного севооборота.

Cladosporium spp. - анаморфные грибы, возбудители темно-оливковой плесени посадочного материала хвойных пород, также поражающие преимущественно ослабленные растения. Симптомами кладоспориоза являются изначальное потемнение хвои, приобретающей на последующих этапах патогенеза оливковый оттенок, и появление на поверхности тканей буровато-оливкового мицелия (рисунок 7). Спороношение и, следовательно, заражение растений происходит в течение всего вегетационного периода при благоприятных для развития гриба условиях. Интенсивному распространению болезни способствует повышенная влажность воздуха, часто выпадающие осадки, резкая смена суточных температур [1].

Возникновение кладоспориоза, по данным различных авторов, в большинстве случаев обусловлено нарушением условий

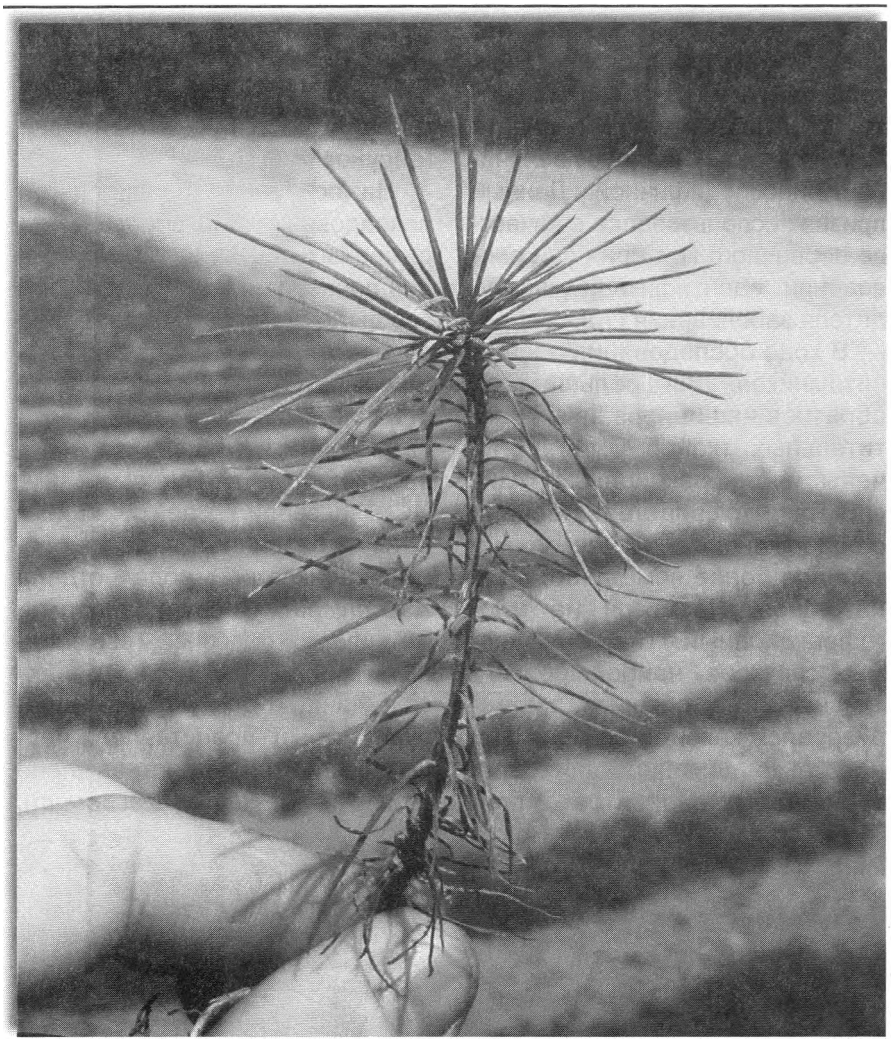


Рисунок 6. Симптомы фомоза сеянцев сосны обыкновенной

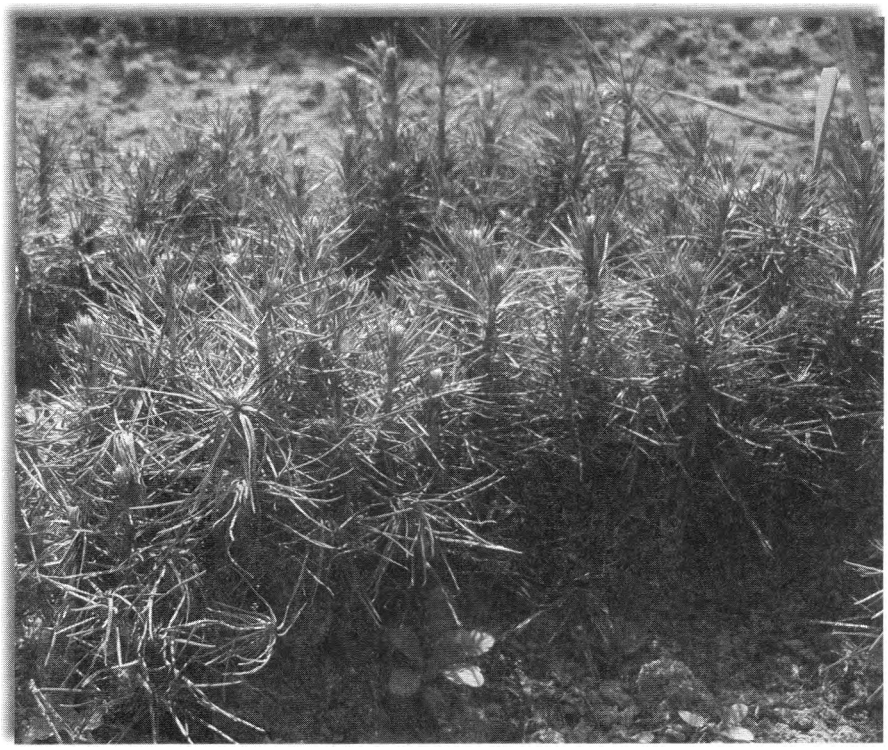


Рисунок 7. Внешние симптомы кладоспориоза сеянцев сосны обыкновенной

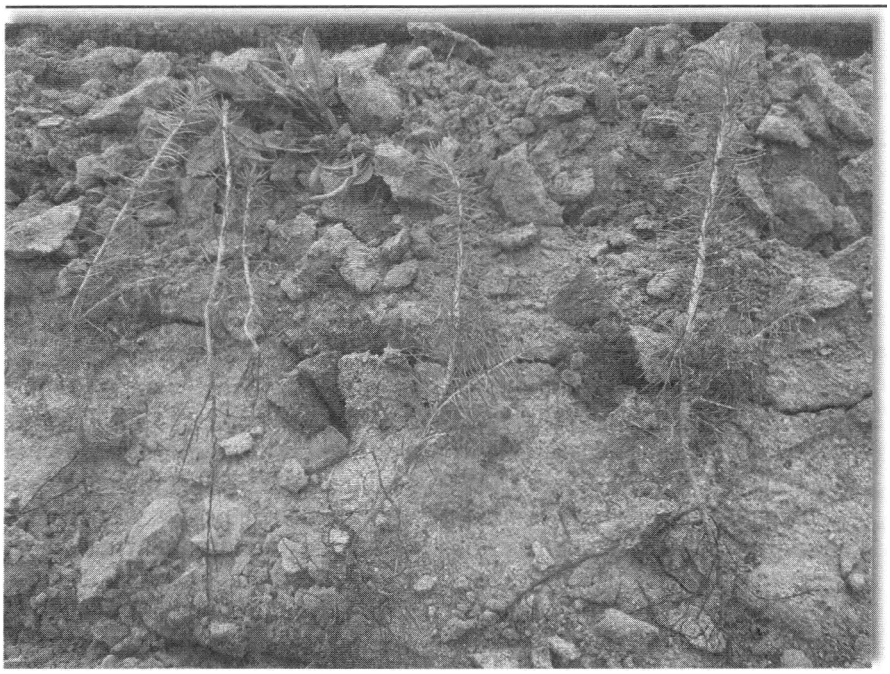


Рисунок 8. Внешние симптомы альтернариоза саженцев ели европейской

хранения посадочного материала и агротехники выращивания. Источником инфекции в лесных питомниках служат отмершие растительные остатки, на которых *Cladosporium* может существовать сапротрофно на протяжении длительного периода. Кроме того, возбудители кладоспориоза в незначительном количестве представлены в эпифитной микрофлоре здоровых растений.

На начальном этапе развития болезни, исходя из литературных материалов, эффективным является использование фунгицидов на основе 12-оксофитодиеновой кислоты (12-охо-PDA), что позволяет в полной степени оздоровить посадочный материал [14]. В случае эпифитотий целесообразным является полное удаление пораженных сеянцев и отмерших растительных остатков. При этом следует производить уничтожение (сжигание) растительного материала за пределами питомника.

Рисунок 9. Симптомы поражения посадочного материала туи (биоты восточной) Ep. nigrum

Грибы рода *Alternaria* являются возбудителями альтернариоза - сухой пятнистости хвои и листьев. Темно-коричневые или черные некротические пятна пораженных участков ткани могут появляться и на стебле. На поздних стадиях заболевания на пораженной хвое, которая становится бурой, и на веточках появляется бархатистый налет мицелия черного цвета. Споры с пораженных участков тканей легко переносятся ветром на большое расстояние и становятся новым источником инфекции. Как правило, больные растения располагаются очагами. Спорообразованию способствует частая смена сухой и влажной погоды [1].

Растения, ослабленные неблагоприятными погодными или почвенными условиями, более восприимчивы к альтернариозу. Как отмечается в ряде работ, факторами, способствующими развитию альтернариоза, являются: нарушение агротехники выращивания, недостаток влаги в почве, низкое содержание азота и калия, избыточное количество фосфора, а также пораженность семенного материала вирусами, ризоктониозом и другими болезнями.

Наиболее действенный метод защиты от альтернариоза - химический. Защитные обработки против альтернариоза следует проводить после обнаружения первых симптомов заболевания. Высокую эффективность, по данным различных исследователей, показали фунгициды на основе дифолатана. В годы депрессивного развития альтернариоза достаточно 1-2 обработок фунгицидами, в годы умеренного проявления болезни - 2-3, в эпифитотийные - 3-4.

Epicoccun nigrum - широко распространенный гриб отдела аскомикота, являющийся возбудителем заболеваний большого числа сельскохозяйственных культур и лесных видов расте-

ний. Особенностью *Ep. nigrum* является выработка видоспецифического пигмента, проявляющего фунгицидную активность по отношению к другим грибам. Симптомом поражения эпикокком является изменение окраски (побурение) хвои (рисунок 9) [1].

По литературным данным, возникновение эпикоккоза в большинстве случаев также обусловлено нарушением условий хранения посадочного материала и агротехники выращивания. Источником инфекции в лесных питомниках служат отмершие растительные остатки, на которых *Ep. nigrum* может существовать сапротрофно на протяжении длительного периода. Кроме того, данный патоген в незначительном количестве присутствует как эндофитный гриб у здоровых растений.

На начальном этапе развития болезни, по мнению ряда авторов, эффективным является 3-хкратная обработка вегетирующих сеянцев системными фунгицидными препаратами, содержащими дифеноконазол, что позволяет остановить развитие патогенеза [16]. В случае эпифитотий также целесообразным является полное удаление пораженных сеянцев и отмерших растительных остатков.

Как видно из таблицы, в двух обследованных питомниках был выявлен фитопатогенный гриб *Sphaeropsis sapinea* - возбудитель диплодиевого некроза (диплодиоза) хвойных. Данный патоген представляет большую потенциальную опасность для многих местных видов хвойных растений. Эпифитотии диплодиоза наносят огромный ущерб лесному хозяйству США, Канаде и ряду стран Европы [17]. Эпитофийное развитие диплодиоза сосны на всей территории Беларуси было впервые отмечено в 2009 году.

Sph. sapinea вызывает поражение и отмирание молодых побегов хвойных в лесных питомниках, лесных культурах и молодняках в возрасте до 25-30 лет. Внешними признаками заболевания посадочного материала диплодиозом является частичное или полное усыхание центрального и боковых побегов текущего года прироста, приводящее в дальнейшем к полному усыханию растения (рисунок 10).

Кроме диплодиоза, в ряде лесхозов у интродуцентов были выявлены случаи инвазивных для Беларуси фитозаболеваний: мериоз лиственницы; склерофомоз туи; не имеющие микологического описания виды патогенных аскомицетов, выявленные у пихты, и др. Данный факт указывает на необходимость организации эффективного фитосанитарного контроля закупаемых семян и посадочного материала.

В целом, анализируя видовой спектр патогенных микромицетов, выявленных в посадочном материале хвойных видов, следует отметить, что наибольшее число выявляемых болезней лесных древесных пород являются неспецифическими и связаны в основном с поражением ослабленных растений. В свою очередь, первичное ослабление сеянцев и саженцев было вызвано длительным воздействием внешних неблагоприятных факторов. Среди них можно выделить антропогенные: нарушение агротехники выращивания посадочного материала, несоблюдение условий хранения, технологии предпосевной обработки и посева семян; абиотические: метеорологические (повреждение низкими и высокими температурами, градом и др.), гидрологические (засуха, переувлажненность), эдафические (неблагоприятные почвенные условия); биотические (механические повреждения насекомыми, клещами-фитофагами и другими живыми организмами).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Обобщая результаты молекулярно-фитопатологического анализа посадочного материала в

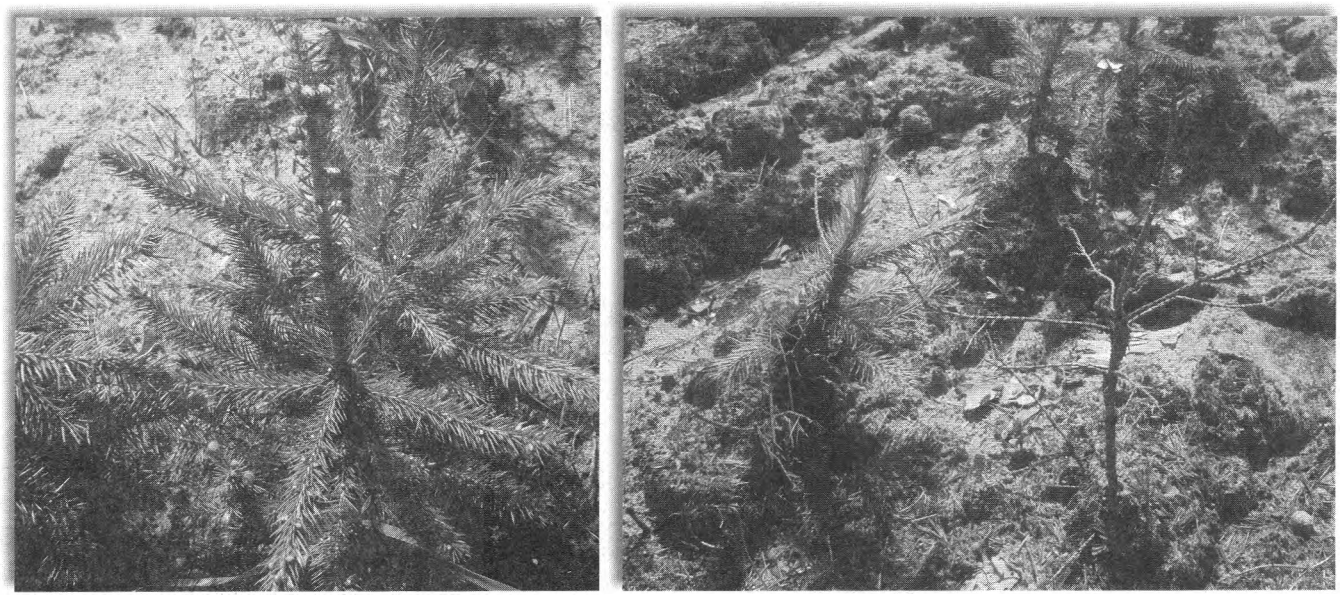


Рисунок 10. Внешние симптомы диплодиоза саженцев ели европейской

исследованных лесных питомниках, можно сделать следующие выводы:

• использование методов молекулярной генетики позволяет на качественно новом уровне проводить раннюю диагностику и идентификацию болезней посадочного материала в лесных питомниках. Методы ДНК-анализа позволяют выявлять и идентифицировать фитопатогены как в посадочном материале,так и в объектах окружающей среды (почве, растительных остатках и др.). Кроме того, существенными моментами ДНК-диагностики, в отличие от визуальной фитопатологической оценки, являются точная постановка диагноза, а также возможность выявления болезней на самых ранних стадиях ее развития;

• выявленные в ходе исследования питомников доминирующие фитозаболевания, по литературным данным, являются неспецифичными и связаны в основном с поражением ослабленных растений. Причинами ослабления посадочного материала могут выступать нарушение агротехники выращивания или воздействие неблагоприятных метеорологических факторов;

• в случае возникновения стрессовых для посадочного материала внешних условий, а также появления очагов болезни желательно применять широкий спектр фунгицидов, имеющих неодинаковую эффективность по отношению к различным видам патогенов;

• особое внимание необходимо уделить фитосанитарному контролю закупаемых семян и посадочного материала интродуцентов, что связано с угрозой появления и распространения новых видов возбудителей болезней;

• в случае культивирования посадочного материала интродуцентов для предотвращения ослабления растений необходимо в максимальной степени соблюдать соответствие климатических и эдафических условий их выращивания.

ЛИТЕРАТУРА

1. Лесная фитопатология: Учеб. для студентов специальности «Лесное хозяйство» / Н.И. Федоров. - Мн.: БГТУ, 2004. - 462 с.
2. Билай, В.И. Микроорганизмы - возбудители болезней растений (справочник) / В.И. Билай [и др.]. - Киев: Наукова думка, 1988. - 550 с.

Семенкова, И.Г. Фитопатология: Учебник для студ. Вузов / И.Г. Семенкова, Э.С. Соколова. - М.: Издательский центр «Академия», 2003. - 480 с.

4. Дьяков, Ю.Т. Общая и молекулярная фитопатология / Ю.Т. Дьяков. - М.: Общ-во фитопатологов, 2001. - 301 с.
5. Падутов, В.Е. Методы молекулярно-генетического анализа / В.Е. Падутов, О.Ю. Баранов, Е.В. Воропаев. - Мн.: Юнипол, 2007. - 176 с.
6. White, T.J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics / T.J. White [et al.] // in PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications (Innis, M. A., D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White eds.). - New York: Academic Press Inc. - 1990. - P. 315-322.
7. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/
8. Баранов, О.Ю. Молекулярно-генетическое маркирование патогенеза лесных древесных видов / О.Ю. Баранов, В.Е.Падутов, С.В. Пантелеев // Вес. Нац. акад. навук Беларуси Сер. б1ял. навук. Прилож. к журналу «Молодежь в науке - 2009». - 2010. - Ч. 4. - С. 10-12.
9. Development of PCR primers from internal transcribed spacer region 2 for detection of Phytophthora species infecting potatoes / P.W. Tooley [et al.] // Appl. Environ. Microbiol. - 1997. - V. 63. - P. 1467-1475.
10. Баранов, О.Ю., Ошако, Т., Каган, Д.И. Выявление и видовая идентификация патогенных грибов с помощью ДНК-маркеров (на примере фитофторы) / О.Ю. Баранов, Т. Ошако, Д.И. Каган // Проблемы лесоведения и лесоводства: Сб. науч. трудов ИЛ ИАН Беларуси.— Вып. 67.— Гомель: ИЛ НАН Беларуси, 2007.— С. 111-118.
11. Griffiths, R.I. Rapid method for coextraction of DNA and RNA from natural environments for analysis of ribosomal DNA- and rRNA-based microbial community composition / R.I. Griffiths [et al.] // Appl. Environ. Microb., 2000. - V.66 - P. 5488-5491.
12. Гапиенко, О.С. Атлас болезней лесных пород Беларуси / О.С. Гапиенко [и др.]; Министерство лесного хозяйства Республики Беларусь. - Минск: Ред. журн. «Лесное и охотничье хозяйство», 2011. - 160 с.
13. http://www.forestpests.org/nursery/phomablight.html
14. Zhou, Y. Synthetic molecular mimics of naturally occurring cyclopentenones exhibit antifungal activity towards pathogenic fungi / Y, Zhou [et al.] // Microbiology, 2011. - 157. - P. 3435-3445.
15. http://pmep.cce.cornell.edu/profiles/fung-nemat/aceticacid-etridiazole/captafol/
16. http://www.agrocn.com
17. Peterson, G.W. Diplodia Blight of Pines / G.W. Peterson //Forest Insect & Disease Leaflet. - 1981. - V. 161. - 6 p.