

### *Chygrynets V.P., Rumyantsev M.G., Solodovnik V.A., Buksha M.I.* Features of Forming and Regeneration for Oak Stands in a Fresh Maple-lime Oak Forest in the Left-Bank Forest Steppe

Forming and growth features are identified for natural oak stands of seed origin in the Left-Bank Forest Steppe. Quantitative and qualitative state dynamics is analyzed for advance growth of principal and associate species under a shelterwood of parent stands. After a seed year, a mass oak sprouting (over 70 thousand pcs·ha<sup>-1</sup>) was observed, equally spaced in the area. Scientifically-based measures are developed for the natural oak forests' seed regeneration in the region.

**Keywords:** natural oak forest stands, advance growth, young seedling, fresh maple-lime oak forest, Left-Bank Forest Steppe.

УДК 630\*[14+44]

### МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНА ДІАГНОСТИКА *BACILLUS PUMILUS* У СОСНОВОМУ ДЕРЕВОСТАНІ

*Ю.І. Шаловило<sup>1</sup>, В.А. Ковальова<sup>2</sup>, Р.Т. Гут<sup>3</sup>*

Представлено методику визначення ДНК бактерій штаму *Bacillus pumilus* у тканинах сосни звичайної (*Pinus sylvestris* L.) шляхом полімеразно-ланцюгової реакції (ПЛР) із використанням видоспецифічних праймерів. Цю методику апробовано для ідентифікації *B. pumilus* у природному пристиглому сосновому деревостані. Виявлено присутність бактерій *B. pumilus* у тканинах дерев із характерними ознаками бактеріальної водянки, що підтверджує їх участь у патологічному процесі. Обстежено санітарний стан соснових насаджень різних класів віку у Судовошиянському лісництві ДП "Самбірське лісове господарство".

**Ключові слова:** *Bacillus pumilus*, сосна звичайна, бактеріальне ураження, ПЛР-аналіз.

**Вступ.** Сосна звичайна (*Pinus sylvestris* L.) – це одна із основних деревних порід, яку використовують для лісорозведення та лісовідновлення на території України. Тому збитки від хвороб цієї рослини є особливо відчутними як в економічному, так і в екологічному аспектах. Відомо кілька сотень збудників хвороб на сосні звичайній, серед яких і бактеріальні патогени, що спричиняють такі захворювання, як пухлиноподібний бактеріоз, бактеріальну водянку, бактеріальний опік, бактеріоз однорічних сіянців та ін. [4, 12, 15]. Вважається, що наукові дослідження щодо збудників бактеріальних захворювань і викликаного ними патогенезу сосни мають фрагментарний характер, що пов'язано як недооцінкою безпеки бактеріозів для соснових деревостанів, так і складністю виділення та ідентифікації мікроорганізмів.

Встановлено, що бактерії штаму *Bacillus pumilus*, виділені з тканин сосни звичайної із ознаками бактеріального ураження, проявляють патогенні властивості щодо рослин цього виду [1, 2, 11]. Симптоми захворювання, спричинені бактеріями *B. pumilus*, подібні до бактеріальної водянки, небезпечної хвороби деревних рослин. Тому на сьогодні є актуальним питання щодо розроблення системи швидкої діагностики *B. pumilus* для моніторингу бактеріозів сосни і розроблення методів захисту лісу від бактеріальних інфекцій.

Упродовж останнього десятиліття у лісовому господарстві дедалі ширше починають застосовувати методи молекулярної генетики та біотехнології, зокрема для ідентифікації ДНК патогена, з використанням видоспецифічних праймерів [9, 10]. ПЛР-аналіз інтенсивно розвивається для діагностики грибкових захворювань лісу, також за його допомогою було ідентифіковано бактерії, що асоційовані з бактеріальною водянкою берези та ліщини [6].

**Мета дослідження.** Визначення санітарного стану соснових насаджень Українського Розточчя, що належать до різних вікових груп та ідентифікація штаму *B. pumilus* у тканинах деревини *Pinus sylvestris* L. зі симптомами бактеріального ураження.

**Об'єкти та методика дослідження.** Для проведення дослідження було закладено тимчасові пробні площі (ТПП) у соснових деревостанах різного віку Судовошиянського лісництва ДП "Самбірського лісового господарства" (згідно з вимогами СОУ 02.02-37-476.2006) [8], що належать до природно-кліматичних умов Розточчя. Категорію санітарного стану дерев визначено за "Санітарними правилами в лісах України" [13]. Під час візуального обстеження санітарного стану дерев на ТПП відзначали симптоматичні дерева, які характеризувались наявністю на стовбурі тріщин із витіканням рідини, як одною із основних ознак бактеріального ураження. Таксаційні показники деревостанів на ТПП визначено з використанням нормативно-довідкових матеріалів [7].

Із симптоматичних дерев відбирали зразки деревини, які поміщали на окремі чашки Петрі з картопляним агаром. Чашки інкубували у термостаті протягом 2 діб за температури оптимальної для росту бактеріальних колоній +30 °С. Бактеріальні колонії переносили у рідке картопляно-декстрозне середовище й інкубували за той же температури. Для виділення бактеріальної ДНК використовували 300 мкл 24-годинної бактеріальної суспензії, що осаджували центрифугуванням за 13000 об./хв протягом 5 хв. Осад розчиняли та інкубували з 300 мкл лізоцим-лізуювального буферу (100 мМ NaCl; 0,5 М трис-НСl, рН 8,0; 10мг/мл лізоциму) протягом 1 год за температури +37 °С та додавали 200 мкл ДСН-лізуювального буферу (100 мМ NaCl; 0,5 М трис-НСl, рН 8,0; 10 % додецилсульфату натрію (ДСН)). Вміст мікропробірки перемішували та витримували 10 хв за температури +65 °С. Із отриманого супернатанту, відділеного від протеїну, після додавання 500 мкл суміші хлороформ: ізоамілового спирту (24:1), преципітували ДНК, додаючи 1/2 об'єму 7,5 М амоній ацетату та рівний об'єм холодного ізопропанолу. Після інкубації вмісту за –20 °С, ДНК осаджували центрифугуванням за 12000 об./хв. Нуклеїнову кислоту промивали 2-3 рази у 70 %-му етанолі та розчиняли в 20-50 мкл автоклавованої дистильованої води.

Для ідентифікації бактерій *B. pumilus* використовували метод ПЛР-аналізу із видоспецифічними праймерами до гену целюлази (GenBank: GQ849198.1): прямий (Vp-1 TCAAATCAAGTGGGCAAC) та зворотний (Vp-2 GAGGCATCCCATATATTCG) [5]. ПЛР – ампліфікацію проводили в 25 мкл суміші, що містила 1 мкл тотальної ДНК бактерій, однократний ПЛР буфер (Fermentas), 1 мМ MgCl<sub>2</sub> (Fermentas), 0,2 мМ дНТФ (Fermentas), по 0,5 мкМ праймерів та 0,5 у.о. Тақ полімерази (Fermentas). ПЛР здійснювали за допомогою ампліфікатора Proteus (Helena BioSciences, Англія) за умови: денатурація за

<sup>1</sup> аспір. Ю.І. Шаловило – НЛТУ України, м. Львів;

<sup>2</sup> ст. наук. співроб. В.А. Ковальова, канд. біол. наук – НЛТУ України, м. Львів;

<sup>3</sup> проф. Р.Т. Гут, д-р біол. наук – НЛТУ України, м. Львів

95 °С протягом 5 хв із подальшими 25 циклами ампліфікації (95 °С – 1 хв; 52 °С – 1 хв; 72 °С – 1 хв) і елонгація за 72 °С протягом 5 хв. Очікувана довжина продукту ампліфікації – 1461 п.н. Розділення продуктів ПЛР проводили в 1 %-му агарозному гелі у трис-боратній буферній системі (50 мМ трис-Н<sub>3</sub>В<sub>О</sub><sub>3</sub>, рН 8,3; 2 мМ ЕДТА), зафарбовували бромистим етидієм (0,5 мкг/мл), візуалізували в УФ-світлі та фотографували.

**Результати дослідження та їх обговорення.** Усі пробні площі закладено в умовах В<sub>2</sub>-дС (свіжому дубово-сосновому суборі) у насадженнях різних класів віку: молодняку I класу, молодняку II класу, середньовікових, пристиглих та стиглих.

За результатами оцінювання санітарного стану дерев на ТПП вираховували середній зважений індекс санітарного стану насаджень (*Ic*), який визначали діленням суми добутків кількості дерев кожної категорії стану і балів відповідних категорій стану на загальну кількість дерев у переліку. Ми не виявили залежності між кількістю дерев з ознаками бактеріального ураження та значенням індексу санітарного стану або/чи віком насаджень (табл.). Так, найбільше дерев із витіканням рідини на стовбурі виявлено у пристиглому насадженні, де *Ic* був найнижчим і становив 2,01. Дещо менше дерев із симптомами бактеріального ураження, а саме 19 % – знайдено у 39-річному насадженні, де *Ic*=2,29. Тоді як на інших ТПП виявлено тільки поодинокі симптоматичні дерева.

Табл. Санітарний стан соснових насаджень

Клас віку	Вік, роки	Розподіл дерев за категоріями санітарного стану, %						Індекс сан. ст. ( <i>Ic</i> )	Потенційно уражено бактеріозом, %
		I	II	III	IV	V	VI		
Молодняк I класу	15	27	25	20	13	6	9	2,73	1
Молодняк II класу	39	27	41	15	12	3	2	2,29	19
Середньовіковий	58	19	35	28	15	1	2	2,50	7
Пристиглий	73	35	38	21	4	1	1	2,01	32
Стиглий	88	24	47	23	3	1	2	2,16	9

Для молекулярно-генетичної діагностики штаму *B. pumilus* вибрано ТПП №4, закладену у 73-річному насадженні, де виявлено найбільшу кількість дерев із ознаками бактеріального ураження, зокрема на стовбурах дерев були тріщини, як з невеликими, так і рясними смолотечами (рис. 1). У червні 2016 р. провели відбір 32 зразків уражених тканин деревини сосни звичайної та трьох зразків із здорових дерев. Дереву із симптомами захворювання на ТПП розміщувалися здебільшого групами по 7-10 дерев, що може свідчити про інфекційний характер ураження.

Після інкубування зразків на живильному середовищі у чашках Петрі навколо 18 зразків деревини спостерігали за ростом міцелію гриба, а навколо 14 – за ростом колоній бактерій. Варто зауважити, що навколо деревини, де розвивався міцелій, встановлено слабкий ріст бактеріальних штамів, і навпаки. У чашках Петрі зі зразками деревини із здорових дерев спостерігався ріст поодиноких колоній бактерій тільки навколо одного зразка із трьох. Колонії бактерій переносили у рідке поживне середовище. Із 24-годинних бактеріальних суспензій виділяли тотальну ДНК бактерій.



Рис. 1. Смолотечі на 73-річних деревах: А – малі смолотечі; Б – рясні смолотечі

Для ідентифікації *B. pumilus* у відібраних зразках використано ПЛР-аналіз із використанням специфічних праймерів [5]. У реакційну суміш вносили виділену ДНК бактерій та праймери Вр1 та Вр2, специфічні до гена целюлази штаму *B. pumilus*. Присутність ДНК *B. pumilus* визначали за наявністю продукту довжиною 1461 п.н. (рис. 2).

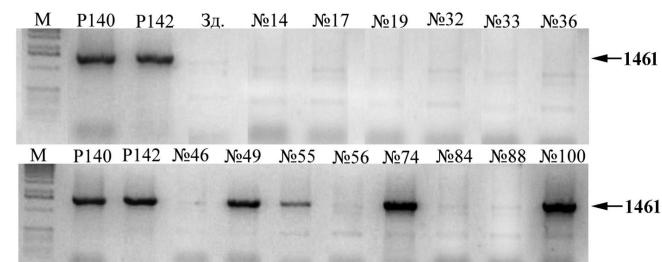


Рис. 2. Електрофоретичний аналіз продуктів ампліфікації сумарної ДНК бактерій із геноспецифічними праймерами для штаму *B. pumilus*: М – маркери 1 kb DNALadderPlus (Fermentas); доріжка P140 та P142 – ДНК *B. pumilus* (позитивний контроль); доріжка Зд. – сумарна ДНК бактерій, що обросли навколо деревини зі здорового дерева; доріжки № 14, 17, 19, 32, 33, 36, 46, 49, 55, 56, 74, 84, 88, 100 – сумарна ДНК бактерій, що обросли навколо деревини із симптоматичних дерев

Електрофоретичний аналіз ПЛР-продуктів показав присутність ДНК *B. pumilus* тільки у 4 зразках. А саме у тканинах деревини, відібраних з уражених дерев під номерами 49, 55, 74 та 100. На стовбурі дерев № 55 та 74 виявлено великі тріщини, темна "мокра деревина" і кислий запах витікаючої рідини, що є характерними ознаками бактеріальної водянки. На деревах № 33, 36, 56 також спостерігались великі тріщини із інтенсивними смолотечами, але без характерного запаху кислого бродіння. У зразках деревини із цих дерев присутність бактерій *B. pumilus* не визначено. На стовбурі дерев № 49 та 100 спостерігалися невеликі за розміром смолотечі без кислого запаху, але ДНК бактерій *B. pumilus* в

зразках із цих дерев було виявлено. Такі ж смолотечі знайдено ще у 20 дерев, що розмішувалися навколо зазначених вище у радіусі 7-10 м. Навколо тканин із цих дерев спостерігали за ростом міцелію гриба і колоній бактерій. Проте ДНК бактерій *B. pumilus* не виявлено.

Розвиток бактеріальної інфекції зазвичай має системний характер, тобто збудник поширюється по судинній системі рослин, одночасно заселяє практично всі її частини і проникає в насіння. Бактерії *B. pumilus* здатні рухатися по тканинах деревини, а також присутні серед аутомікрофлори насіння [3]. Це може представляти реальну загрозу у лісовому господарстві, через ураження та втрату ділової деревини, а також інфікування проростків сосни звичайної вже під час проростання насіння.

**Висновки.** Отже, з'ясовано, що в уражених тканинах деревини з дерев, які характеризувались наявністю тріщин із смолотечами, присутні гриби та/або бактерії. Використовуючи методику на основі полімеразно-ланцюгової реакції зі геноспецифічними праймерами Vp1 та Vp2, ідентифіковано бактерії штаму *B. pumilus* у зразках деревини з дерев із характерними ознаками бактеріальної водянки [14], що свідчить, що ці бактерії є однією з причин розвитку патологічного процесу. Окрім цього, бактерії *B. pumilus* виявлено в деревах на початковій стадії розвитку бактеріозу, що робить перспективним використання цієї методики для ранньої діагностики хвороби. Запропонована методика молекулярно-генетичної діагностики дасть змогу оперативно проводити контроль насіння на зараженість *B. pumilus*, лісопатологічний моніторинг поширення цього патогена у деревостанах для раціонального планування лісозахисних заходів.

### Література

1. *Bacillus pumilus* – a new phytopathogen of Scots pine / V.A. Kovaleva, Y.I. Shalovylo, Y.N. Gorovik [et al.] // Journal of forest science. – 2015. – Vol. 61(3). – Pp. 131-137.
2. *Bacillus pumilus* – новий фітопатоген сосни обыкновенной / Ю.Н. Горовик, Ю.И. Шаловило, В.А. Ковалева та др. // Труды БГУ : сб. науч. тр. – 2012. – Т. 7, ч. 1. – С. 194-198.
3. Гвоздяк Р.І. Лісова фітопатобактеріологія / Р.І. Гвоздяк, А.Ф. Гойчук, В.В. Розенфельд; навч. посібн. / за ред. проф. А.Ф. Гойчука. – К. : Вид. дім "Вініченко". – 2014. – 252 с.
4. Гойчук А.Ф. Бактеріальні хвороби сосни звичайної / А.Ф. Гойчук, В.В. Розенфельд // Наукові праці Лісівничої академії наук України : зб. наук. праць. – Львів : РВВ НЛТУ України. – 2011. – Вип. 9. – С. 130-136.
5. Горовик Ю.Н. ПЦР – диагностика бактерий *Bacillus pumilus* / Ю.Н. Горовик, А.Л. Лагоненко, А.Н. Евтушенков // Труды БГУ : сб. науч. тр. – Т. 9, ч. 1. – 2014. – С. 162-166.
6. Баранов О.Ю. Молекулярно-генетическая диагностика грибных болезней в лесных питомниках / О.Ю. Баранов, В.А. Яромлович, С.В. Пантелеев та др. // Лесное и охотничье хозяйство: сб. науч. тр. – 2012. – № 6. – С. 21-29.
7. Нормативно-справочные материалы для таксации лесов Украины и Молдавии / под ред. А.З. Швиденко. – К. : Изд-во "Урожай", 1987. – 560 с.
8. Площі пробні лісовпорядні. Метод закладання: СОУ 02.02-37-476: 2006. – [Чинний від 2007-05-01]. – К. : Мінагрополітики України, 2006. – 32 с. – (Стандарт Організації України).
9. Алимова Т.С. Применение методов молекулярной генетики для анализа наличия фитопатогенов в лесных насаждениях и питомниках Российской Федерации / Т.С. Алимова, В.А. Сиволапов, Н.А. Карпеченко та др. // Сибирский лесной журнал. – 2014. – № 4. – С. 35-41.
10. Применение молекулярно-генетических методов в лесном хозяйстве Беларуси / В.Е. Падутов, О.Ю. Баранов, Д.И. Каган та др. // Сибирский лесной журнал : сб. науч. тр. – 2014. – № 4. – С. 16-20.

11. Шаловило Ю.І. Реакція рослин *Pinus sylvestris* L. при взаємодії з бактеріями родів *Bacillus*, *Paenibacillus* та *Pseudomonas* / Ю.І. Шаловило, В.А. Ковальова, Р.Т. Гут та ін. // Науковий вісник НЛТУ України : зб. наук.-техн. праць. – Львів : РВВ НЛТУ України. – 2012. – Вип. 22.13. – С. 62-70.
12. Рыбалко Т.Н. Бактериозы хвойных Сибири / Т.Н. Рыбалко, А.Б. Гукасян. – Новосибирск : Изд-во "Наука". – 1986. – 80 с.
13. Санітарні правила в лісах України (затвержені наказом Міністерства аграрної політики та продовольства України від 21.03.2012 р., № 136). [Електронний ресурс]. – Доступний з <http://zakon2.rada.gov.ua/laws/show/z0505-12>. – Дата звернення: 5.05.2016 р.
14. Шаловило Ю.І. Діагностика дерев сосни зі симптомами бактеріальної водянки / Ю.І. Шаловило // Геноміка рослин та біотехнологія : матер. 1-ої Міжнар. наук. конф.; Біологія рослин та біотехнологія : матер. 2-ої наук. конф. молод. вчених, 23-24 грудня 2013. – К. – С. 40-53.
15. Шаловило Ю.І. Типи бактеріальних хвороб хвойних рослин / Ю.І. Шаловило, В.А. Ковальова, Р.Т. Гут // Науковий вісник НЛТУ України : зб. наук.-техн. праць. – Львів : РВВ НЛТУ України. – 2011. – Вип. 21.13. – С. 68-72.

Надійшла до редакції 08.09.2016 р.

### Шаловило Ю.И., Ковалева В.А., Гут Р.Т. Молекулярно-генетическая диагностика *Bacillus pumilus* в сосновом древостое

Представлена методика определения ДНК бактерий штамма *Bacillus pumilus* в тканях сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) путем полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием видоспецифических праймеров. Эту методика апробирована для идентификации *B. pumilus* в естественном сосновом древостое. Обнаружено присутствие бактерий *B. pumilus* в тканях деревьев с характерными признаками бактериальной водянки, что подтверждает их участие в патологическом процессе. Проведено обследование санитарного состояния сосновых насаждений разных классов возраста в Судово-вышневском лесничестве ГП "Самборское лесное хозяйство".

**Ключевые слова:** *Bacillus pumilus*, сосна обыкновенная, бактериоз, ПЦР-анализ.

### Shalovylo Yu.I., Kovaleva V.A., Gout R.T. Molecular Genetic Identification of *Bacillus Pumilus* in a Pine Stand

The method of identification of *Bacillus pumilus* DNA in *Pinus sylvestris* L. tissues by polymerase chain reaction (PCR) using specific primers was presented. This method was tested for the identification of *B. pumilus* strain in a 73 – years old pine stand. The presence of *B. pumilus* DNA in tissues of pine trees with characteristic signs of bacterial dropsy, which confirms participation of *B. pumilus* in the pathological processes, was established. The diagnostics of sanitary conditions in the pine plantations of different age classes in Sudova Vyshnya Forestry of Sambir State Forest Enterprise was conducted.

**Keywords:** *Bacillus pumilus*, Scots pine, bacteriosis, PCR analysis.