

ХРОНИКА

**НА ОСТРИЕ ФИТОПАРАЗИТОЛОГИИ:
МЕЖДУНАРОДНЫЙ СИМПОЗИУМ
ПО БОЛЕЗНИ ВИЛТА СОСНЫ, НАНКИН, 2009**

© А. Ю. Рысс,¹ Зао Богуан,² О. А. Кулинич³

¹ Зоологический институт РАН
Университетская наб., 1, С.-Петербург, 199034

² Нанкинский университет лесоводства

³ Всероссийский центр карантина растений
Поступила 18.03.2010

Международный симпозиум по болезни вилта сосны под эгидой Международного союза лесных исследовательских организаций (IUFRO) состоялся в Нанкинском университете лесоводства 20—23 июля 2009 г. Здесь дан краткий обзор докладов.

Вилт сосновых — тяжелая паразитарная болезнь хвойных лесов по всему миру, возбудитель которой сосновая стволовая нематода *Bursaphelenchus xylophilus* (ССН), наиболее важный среди нематод карантинный объект мирового значения, включенный Европейской и Средиземноморской организацией по карантину и защите растений (ЕОКЗР) в перечень наиболее важных патогенных организмов А1. Возбудитель вилта ССН на стадии трансмиссивной личинки распространяется с умирающих на интактные деревья переносчиком — жуком усачем рода *Monochamus*. В жизненный цикл нематоды включены также древообитающие грибы и эктосимбионты нематоды — патогенные для хвойных бактерии рода *Pseudomonas*. Нематоды обитают в смоляных ходах древесины, питаются за счет тканей растения в живой древесине и на мицелии грибов-ксилобионтов в мертвом дереве. В 1990 годах ССН проникла в Южную Европу из Южной Азии, вызвав значительный ущерб. Ввиду катастрофического паневропейского распространения вилта в Португалии принята национальная программа PROLUNP разработок технологий для контроля ССН, поскольку утвержденные в ЕС меры недостаточно эффективны (Vieira, Mota; Rodrigues, Sousa). В связи с потеплением климата есть опасность проникновения ССН в Россию, а также возможность гибридизации патогенного вида *B. xylophilus* с распространенным в РФ слабопатогенным близким видом *B. mucronatus*, поскольку факты гибридизации этих видов с приобретением новых биологических особенностей выявлены в Японии (Togashi et al.). Симпозиум собрал 130 исследователей из 12 стран, представившихся 52 докладом на пле-

нарной сессии и 6 тематических секциях, обобщивших фундаментальные и прикладные аспекты опасного паразитарного заболевания.

Фундаментальные концепции вилта. В концепции Футаи (Futai) вилт сосны рассматривается как результат трех разнонаправленных факторов: смерти сосны как предпосылки яйцекладки жуков-переносчиков; наличия специфических грибов в сосне как фактор питания и увеличения численности популяции ССН; микориза как фактор способствующий иммунитету и водоснабжению сосны, т. е. снижающий смертность сосны и дисперсию вилта. В концепции Зао (Zhao) для развития вилта обязательно сочетание двух элементов: нематод группы видов *Bursaphelenchus xylophilus* и бактерий группы видов *Pseudomonas fluorescens* (эктосимбионтов слизистого чехла нематод). Нематоды и бактерии взаимно увеличивают размножение друг друга в больном дереве и в культуре каллюса клеток сосны. Выделен протеин, гомологичный белку-флагеллину *Pseudomonas fluorescens*, который увеличивает плодовитость ССН и вызывает разрушение ДНК и смерть клеток паренхимы флоэмы сосны. Экстрагированный слизистый чехол нематоды подавляет иммунную реакцию растения и увеличивает темп размножения *Pseudomonas*. Аксеничные нематоды *B. mucronatus* (непатогенный вид, из группы *B. xylophilus*) становятся патогенными при внесении бактерий от *B. xylophilus*, а поверхностно дезинфицированные бурсафеленхи обоих видов не вызывают вилта. Смерть дерева в результате вилта облигатна для завершения цикла комплекса ССН — *Pseudomonas*, поскольку умирающее дерево привлекает жуков переносчиков ССН вместе с бактериями-эктосимбионтами.

Патогенность. В тесте на патогенность 2 изолятов ССН из КНР и Японии, для *Cedrus deodara* патогенен лишь японский изолят ССН; оба изолята патогенны для *Pinus thunbergii* и *P. massoniana* (Z. Han et al.). Изолят *Bursaphelenchus mucronatus* (БМ) от *Pinus koraiensis* (ДВ России) вызывал смертность 5-летних саженцев *Pinus koraiensis* и *Larix olgensis* при выживаемости *Pinus sylvestris* и *P. densiflora*. Из 2 изолятов БМ вилт *P. sylvestris* вызывал лишь французский изолят (Кулинич и др.).

Тогаша с соавт. (Togashi et al.) экспериментально проверили гипотезу о генетическом вкладе пришельцев (*Bursaphelenchus xylophilus*) в патогенность местных популяций *B. mucronatus* (БМ) в Японии. Для этого использовалось возвратное скрещивание самцов F1 БМ × ССН с девственными самками родительских популяций БМ и ССН. Предполагали, что цитоплазматическая наследственность полностью определяется девственной самкой. В результате показано, что гибриды с ядерным геномом ССН более патогенны для сосны *Pinus thunbergii* и достигают наибольшей численности на переносчике, чем ядерные гибриды БМ, а цитоплазматическая наследственность для патогенности не существенна. В другом эксперименте из двух изолятов ССН выведены инбредные линии — 3 патогенные и 2 непатогенные для *Pinus thunbergii*, все линии отличались по патогенности между собой и от исходных изолятов, методикой AFLP выявлены гены — маркеры патогенности. Патогенные линии показывали слабое размножение на грибе *Botrytis* (Ichimura et al.). Патогенность не зависит от темпов размножения нематод в культуре гриба, но зависит от их эктосимбионтов: процент проявлений вилта снижается, если инокулюм состоит из ССН, длительно культивируемых на грибе *Botrytis* или из поверх-

ностно дезинфицированных трансмиссивных личинок с жуков (H. Li et al.).

Хозяинно-паразитные отношения — гистопатология хвойных и роль токсинов бактерий — эктосимбионтов нематод. При исследовании гистопатологии однолетних саженцев *Pinus thunbergii* показано, что на начальной стадии вилта миграции нематод однонаправлены (вниз) и очень замедлены; при росте численности нематод движение ускоряется и становится двунаправленным (вверх—вниз); появляются симптомы вилта — некротическая коричневая окраска и деграция камбия, затем кортикальной ткани, флоэмы и паренхимы ксилемы тканей; водный потенциал клеток растений сначала растет, потом падает, потом вновь растет, причем в чувствительных линиях сосны все процессы происходят на 2 сут быстрее, чем в резистентных линиях (Su, Ye).

По мере развития стадий вилта на экспериментально зараженных ветвях *Pinus thunbergii* увеличивается численность бактерий и ССН при доминировании *Pseudomonas fluorescens*, *Pantoea* sp. и *Sphingomonas paucimobilis* (Xie et al.). Выявлено 2 типа ассоциаций ССН с бактериями: эндофитные и собственно нематодные (*Actinobacteria* и *Firmicutes*); эндофитные бактерии *Janthinobacterium agaricidamnorum* и *Dyella yeojuensis* коррелируют с наличием ССН в образцах древесины (Santos et al.).

Поверхностный слизистый чехол нематод — место локализации бактерий-эктосимбионтов. Чехол ССН состоит из протеинов и углеводов, его имеют все паразитические и инвазивные стадии нематод (Shinya et al.). Для изучения роли бактерий в патогенезе вилта сосны поверхность ССН в контроле экспериментов дезинфицируют. Эффективность дезинфицирующих растворов падает в ряду 3 % перекись водорода — 0.1 % хлорид ртути — 4 % хлорноватистый калий; для стерилизации от бактерий достаточно 25 мин при 25 °С, увеличение экспозиции ведет к смертности нематод (Zhang, Zhao).

Для моделирования гистопатологии вилта с участием нематод и бактерий разработана методика получения стерильных культур клеток каллюса из зрелых эмбрионов *P. thunbergii* в темноте и с добавлением гормонов — это позволяет избежать побурения клеток (Gao, Zhao). Это дало возможность тестировать вещества, выделяемые бактериями, на токсичность к клеткам сосны. Бесклеточный фильтрат зрелой культуры линии *Pseudomonas fluorescens* от ССН при диализе оказался многокомпонентным и включающим протеины и мелкие органические молекулы, причем максимальной токсичностью для культур клеток *P. thunbergii* обладает лишь исходный фильтрат или смесь продуктов диализа (M. Xu et al.). Затем из фильтратов *P. fluorescens* выделены флагеллин и два циклических дипептида, все три вещества вызывают деграцию ДНК, ядра и цитоплазмы клеток сосны, электропроводимость последних увеличивается (S. Li et al.). Бактерии *P. fluorescens* от ССН секретируют внеклеточную лигнин-пероксидазу, участвующую в биоразложении лигнина, этот фермент оказался токсичен к суспензии клеток *P. thunbergii* (Kong et al.). Токсичность фильтратов бактерий генетически обусловлена: с помощью мутагенов выведены 2 мутантные линии *Pseudomonas*, чьи фильтраты непатогенны для культур клеток *P. thunbergii* (Q. Wang et al.).

Жизненный цикл и трансмиссия. В группе докладов по механизмам переноса (трансмиссии) ССН жуками представлены новейшие данные по

биологии переносчиков в Южной Европе и Восточной Азии. До сих пор хорошо изучены были лишь 2 ассоциации: нематода *Bursaphelenchus xylophilus* — жук *Monochamus alternates* в Азии и *M. carolinensis* в Северной Америке. Однако для Южной Европы типичен переносчик *Monochamus galloprovincialis*, вторичный ксилобийонт с однолетним циклом, связанный с сосной *Pinus pinaster*. Изучение цикла *M. galloprovincialis* показало, что перенос на хвойное растение происходит главным образом при дополнительном питании созревания (6 недель после вылета и гораздо меньше при последующей яйцекладке жука (Sousa et al.). Трансмиссивные личинки нематод концентрируются в метатораксе жуков, связь нематод с жуком начинается в кукольных камерах жука после окукливания при превращении в незрелое имаго с мягкими покровами (Naves et al.). В Южной Корее с 2006 г. обнаружена ассоциация жук *M. saltuarius* — сосна *Pinus koraiensis*, причем *M. saltuarius* переносит кроме ССН также трансмиссивных личинок нематоды *Bursaphelenchus mucronatus* европейского типа (H. Han et al.). При экспериментальном изучении миграции ССН показано, что древесина, уже зараженная нематодами, наиболее сильно привлекает *B. xylophilus*. Гриб *Botrytis cinerea*, на котором размножают ССН в лаборатории, привлекает нематод значительно сильнее других грибов, причем аттрактивность нефракционированного экстракта гриба сильнее людей из его фракций (Pan, Lon). Экспериментально доказана передача ССН через корневую систему незараженным 7-летним саженцам сосны, а также наличие ССН в корневой системе в естественных лесонасаждениях (Yil-Sung et al.).

Модели распространения *B. xylophilus*. Несколько докладов было посвящено моделированию истории расселения ССН и прогнозированию ущерба от вилта сосны. Рысс представил аллопатрическую модель эволюции, в которой род *Bursaphelenchus* произошел в северной части Пангеи, группа *B. xylophilus* произошла из восточной Азии, а сам вид *B. xylophilus* сформировался в Америке и был антропогенно возвращен в исходный ареал своей видовой группы (Восточная Азия). Предполагается происхождение отряда Aphelenchida в Гондване (по местонахождениям примитивных групп) с продвижением на север в Пангее, в ходе которого в жизненных циклах различных афеленхид независимо возникли ангидробиотические и энтомофильные стадии. Модель Ванга (H. Wang) исторического расселения ССН базируется на фактах концентрации заражения ССН у хозяйственно-важных пунктов в долинах рек Янцзы и Чжуцзян, из чего сделан вывод о международной торговле как о причине распространения вилта сосны в Китае. Для лесонасаждений отдельных провинций КНР разработаны математические модели прогноза распространения ССН по многим переменным, важнейшим из которых: высота над уровнем моря, годовые осадки, сезонность осадков, диапазон ежегодных температур, высота и диаметр кроны (M. Li et al.; Shi et al.).

Ассоциации. При исследовании сосен *Pinus massoniana*, *P. thunbergii*, *P. elliotii*, *P. densiflora*, *P. armendii* обнаружено, что доминирующему виду *Bursaphelenchus xylophilus* сопутствуют 9 видов нематод: *B. mucronatus*, *B. aberrans*, *B. hofmanni*, *B. sp.*, *Aphelenchoides macronucleatus*, *A. vaughani*, *A. bicaudatus*, *Seinura wuae*, *Ektaphelenchoides pini* и *Laimaphelenchus sp.*, причем хищные сейнуры предложены как потенциальный агент биоконт-

роля ССН (Negi, Ye). *Aphelenchoides* с *Pinus thunbergii* описан как новый вид, он отличается от *A. macronucleatus* по молекулярным и морфологическим особенностям (Cheng et al.). Наличие в древесине сосны близких видов и родов афеленхид делает необходимым совершенствование диагностики ССН.

Диагностика. В докладе Брааш и др. (Braasch et al.) представлена попытка приведения морфологической диагностики рода в соответствии с молекулярными данными; выделены 13 групп видов по 6 морфологическим признакам: для удобства диагностики групп предложена иллюстрированная таблица по важнейшим признакам: число инцизур бокового поля, паттерн каудальных папилл самца и форма спикул. В группы попали 73 вида, 24 не классифицированы. Для 39 видов дано древо по гену SSU r-DNA. В остальных докладах доминировала молекулярная диагностика видов. В Южной Корее на основании анализа 15 изолятов бурсафеленхов по ПЦР ITS и D2D3 рДНК (секвенирование и рестрикционный анализ) выявлены *Bursaphelenchus xylophilus*, *B. mucronatus* (европейский подвид на *Pinus koraiensis* и азиатский подвид на *P. thunbergii*), *P. tusciae*, *P. lini*, *P. hylobianum* (H. Han et al.). Ге (Ge) разработал метод паддок проб для идентификации ССН, который благодаря надстройке цикла амплификации (устранения накапливающегося ингибирования ПЦР за счет уникального zip-кода, который гибридизируется на носителе с олигонуклеотидами-праймерами) дает десятикратное улучшение диагностики. Был представлен новый метод диагностики посредством изотермальной специфической амплификации ДНУ ССН прямо из древесной стружки и опилок (Aikawa et al.). Для экспресс диагностики ранних стадий вилта в древесине разработан метод цветного реагента на наличие целлюлозы — при заболевании цвет меняется на белый; для подтверждения наличия ССН используют флуоресцентную молекулярную диагностику в режиме реального времени (ATF-PCR ITS-2) (M. Wang).

Карантин включает систему мер для обнаружения ССН и меры контроля и спецобработки лесоматериалов: обследование для выявления очагов вилта, диагностика ССН, ловушки жуков, манки жуков кусками древесины, карантинные вырубki и обрезка ветвей, уничтожение зараженных деревьев, фумигацию, биометод, повторный контроль площадей (Huang). Обследование территории инфракрасной аэрофотосъемкой позволяет выявлять пораженные вилтом деревья, используя специальную компьютерную программу, а затем находить пораженные деревья в лесонасаждении, используя с GPS навигацию (Nakamura et al.). В Евросоюзе протокол специальных мер при появлении ССН включает 3 км зону сплошной вырубki и 6 км зону карантина, откуда можно брать лесоматериалы после спецобработки и контроля; карантин составляет 15 лет от последнего обнаружения ССН в данной точке (Hannunen). В Южной Корее система мер после диагностики вилта включает изъятие зараженных деревьев, их фумигацию или сжигание, запрет на перемещение древесины из зараженных делянок и 3-годовой контроль площадей первичного обнаружения заболевания (через 3 года в случае отсутствия ССН площадь объявляется селективно чистой) (Shin et al.).

В ЕС утверждены 3 вида карантинной обработки: высокой температурой, фумигация метилбромидом и удаление и сжигание пораженных де-

ревьев. В связи с запретом метилбромида с октября 2010 г. рекомендованы гри альтернативных химиката: фумигант Sulfuryl fluoride, химикаты для инъекций древесины Milbemectin и Emamectine benzoate (Trindade, Cerejeira). Международной конвенцией по защите растений установлены рекомендации для упаковочного материала в международной торговле: 30 мин термообработки 56 °С в центре образца (Allen). Так как ДНК тест определяет и мертвых ССН, для оценки результата термообработки предложен тест ПЦР обратной транскриптазы, основанный на выявлении маркера выживания — гена митохондриальной ДНК кодирующего протеин теплового шока (heat shock protein 70A mRNA) (Leal et al.).

Биометод контроля ССН применим к жукам-переносчикам, самим нематодам и их бактериям-эктосимбионтам. Патогенная линия энтомофильного гриба *Metarhizium* с наездника *Scleroderma* использована против переносчика ССН *Monochamus alternatus*, в местах тяжелого вилта показана эффективность массового выпуска разведенных в лаборатории склеродерм, зараженных грибом (F. Xu et al.). В полевых условиях выпуск *Scleroderma guani* вблизи деревьев дает 20 % заражения переносчика *M. alternatus* (Tang et al.). Выпуск в очаге вилта стерилизованных гамма излучением самцов *Monochamus* spp. по эффективности равен химобработке против жука и значительно дешевле (Zhang et al.).

Против нематод использованы нематотические грибы и продукты растений. В КНР для обработки санитарных вырубок *Pinus massoniana*, зараженных ССН, произведен поиск гриба, эффективно разрушающего древесину сосны и непригодного как источник пищи для ССН. Выбрана линия гриба *Laetiporus sulphureus* (L. Wang et al.). Из почвы выделены 5 линий актиномицетов *Streptomyces* с нематотическими филтратами, методом хроматографии выявлена наиболее нематотическая фракция (Jiang et al.). Гифомицет *Esteya vermicola* — первый эндопаразитический гриб, выделенный из пораженной грибом ССН в Южной Корее. В цикле гриба инвазионные луновидные конидии прикрепляются к кутикуле нематоды и мицелий прорастает внутрь; по мере поедания тела нематоды образуются новые конидии и заражают новых нематод. Выделено несколько агрессивных линий *Esteya*, убивающих популяции ССН за 4—5 дней (C. Wang et al.). Экспериментальный коммерческий продукт на основе *Esteya* вносят на саженцы сосны в виде спрея, инъекцией в ствол суспензии гриба или зараженных грибом нематод, что эффективно излечивает саженцы от вилта (Sung et al.). В Португалии для контроля вилта сосны выбраны масла 4 (из 27) видов ароматических растений, их эффективность падает в ряду: *Thymbra capitata* > *Thymus caespititius* > *Satureja montana* > *Cymbopogon citratus* при норме 1 мг/мл. Нематотическим началом служат корвакол и гераниал (Vieira et al.). В КНР выявлена высокая нематотическая активность вытяжки растения *Cynanchum komarovii*, обусловленная блокированием сукцинат дегидрогеназы у ССН (Yang, Liu).

В лабораторных тестах 6 антибиотиков показана эффективность оксолиновой кислоты против 5 линий бактерий из ССН. Проявления вилта *Pinus densiflora* снижались на 70 % при инъекции 3 мг оксолиновой кислоты в 3-летние саженцы; в полевых экспериментах на 20-летних соснах лечебное действие усиливалось при совместной инъекции оксолиновой кислоты и абомектина (Kim et al.).

В провинции Хунань (КНР) в качестве разработки для мер контроля вилта предложена селекция местных саженцев *Pinus densiflora*, которая уже в первом поколении (от выживших в первом опыте гибридов исходно резистентного и толерантного клонов сосны) приводит к повышению резистентности к ССН (M. Wang).

Симпозиум обобщил фундаментальные концепции паразитарного вилта хвойных с новыми данными о роли симбионтов и переносчиков сосновой стволовой нематоды в патогенезе и трансмиссии заболевания, а также представил комплекс новых технологий по диагностике и контролю возбудителя вилта, включая биометод и новейшие карантинные разработки.
