

**ВИДОВАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ КОМПЛЕКСА СИБИРСКИХ ВИДОВ
ARMILLARIA MELLEAE S.L. (на примере *Armillaria borealis*)**

Юшкова Т.Ю.^{1,3}, Шеллер М.А.¹

научный руководитель канд. биол. наук Шилкина Е.А.^{1,2}

1 – Филиал ФБУ «Рослесозащита» Центр защиты леса Красноярского края

2 – Сибирский федеральный университет

3 – ФГБОУ ВПО «Сибирский государственный технологический университет

Лесные экосистемы на территории Сибири подвержены воздействию разнообразных деструктивных факторов. В связи с этим расширяется зона поражения лесов, вызванных грибными заболеваниями. Одним из опасных возбудителей болезней леса является комплекс грибов *Armillaria melleae sensu lato* (опенок осенний), представляющий практический интерес для исследований, так как включает в себя агрессивные виды, приводящие к большим экономическим потерям лесного хозяйства. До настоящего времени видовая идентификация указанного комплекса сибирских видов затруднена из-за его недостаточной изученности.

Цель данной работы – видовая идентификация опенка осеннего с использованием различных методов.

В задачи исследования входило:

1. Отобрать образцы грибов комплекса *Armillaria melleae s.l.* в разновозрастных хвойных древостоях Красноярского края и провести морфологическое описание их плодовых тел;
2. Выделить чистые культуры исследуемых патогенов;
3. Провести тест – скрещивание методом «дикарион-монокарион»;
4. Провести секвенирование амплифицированных участков ДНК образцов с их последующим сравнением с имеющимися последовательностями в генетических базах данных;
5. Сопоставить результаты видовой идентификации.

Решение указанных задач позволяет изучить особенности исследуемого патогена в условиях Сибири, облегчить диагностику данного заболевания, в том числе с использованием инновационных молекулярно-генетических методов.

Объектами исследования были грибы комплекса *Armillaria melleae sensu lato*, отобранные с усыхающих деревьев хвойных и лиственных пород в четырех участках двух лесничеств Красноярского края. Всего было отобрано 10 образцов фитопатогенов. Лесопатологическое обследование указанных территорий показывает, что корневые системы хвойных и лиственных пород всех категорий, включая внешне здоровые, в той или иной степени повреждены гнилями. Периферическая часть древесины разрушается по типу белой волокнистой коррозийно-деструктивной гнили, типичной для рода *Armillaria*.

Макроскопические характеристики опенка осеннего фиксировали на стадии плодовых тел. Сбор и высушивание проводили согласно общепринятым методикам. Для микроскопирования частей сухих плодовых тел методом «раздавленная капля» использовали следующие реагенты: 5%-ый раствор КОН, 3-10%-ый аммиачный раствор Конго красного. Значения количественных показателей основывали на измерении не менее 20 спор и различных специфических структур (базидии, цистиды, пряжки и т.п.).

Плодовые тела пяти из десяти отобранных образцов имели морфологическое описание, которое, согласно определителю Лессо (2003), соответствует виду *Armillaria borealis*:

Шляпка полукругло-выпуклая до распростертой, поверхность темно-кремовая, бледно-охристая. Чешуйки темно-коричневые, лохматые, торчащие вверх, состоящие из нескольких пучков, густо-расположенные в центральной части, более редкие по краям. Поверхность шляпки точечно-крапчатая, иногда местами голая. Край шляпки белесый с остатками частного покрывала, без чешуек, ровный. Пластинки светло-кремовые, почти белые, коротко-низбегающие, частые, с пластиночками. Край пластинок ровный. Пластинки светлыми линиями продолжают до кольца. Кольцо двойное, пушисто-войлочное. Имеется белая ложбинка между верхней и нижней частью кольца. Верхняя часть бело-войлочная. Нижняя часть кольца обычно окрашена в желтоватый и желтый цвет и покрыта многочисленными бурыми отдельно расположенными точечными чешуйками. Ножка цвета пластинок. К основанию имеет буроватый оттенок, само основание темно-бурое. Вся поверхность ножки покрыта клочками частного покрывала с бородавками. Характер роста – пучками, на корневых лапах.

Микроскопирование: базидии булабовидные, длиной 45 мкм, в диаметре 8-10 мкм, септированные, основание с пряжками, это подтверждает, что данное плодовое тело не относится к группе *A. mellea*. Имеются 2-4 стеригмы высотой 5 мкм и более. Споры крупные, в размере 12x8 мкм, формой от овальных до миндалевидных (рис. 1).

Для выделения чистых культур грибов инфицированную древесину и ткани плодовых тел размером (3-5 см) культивировали в чашках Петри на агаризированном сусле (4° по Баллингу) с добавлением агара 1,5 % для уплотнения среды, в термостате при температуре 24-26 °С. Выделенные культуры многократно пересевали, чистоту культур проверяли микроскопированием.



Плодовые тела *Armillaria borealis*

Базидия с 4 стеригмами, пряжкой и спорой

Рисунок 1 – Плодовые тела и микроструктуры

Для видовой идентификации методом «ди-мон»-скрещиваний (дикарион-монокарион) использовали диплоидные изоляты рода *Armillaria mellea s.l.* и тестеры, любезно предоставленные нам в 2006 году доктором Кари Корхоненом (Финляндия). Видовую принадлежность диплоидных культур определяли, срачивая их поочередно со штаммами-тестерами каждой интерстерильной группы. Для постановки эксперимента использовали метод совместного культивирования. В качестве инокуляционного материала служили агаровые блоки с мицелием, вырезанные из краевой зоны колоний грибов. Блоки помещали в чашку Петри попарно на расстоянии 2 см друг от друга, около 3 см от бортика чашки. Чашки инкубировали в течение 4 недель. К одной интерстерильной группе диплоидный изолят относили при явном изменении морфологии хотя бы одного из четырёх тестеров на крустозный тип мицелия и отсутствием демаркационной линии на границе двух культур.

Согласно результатам тест – скрещивания, которое основано на сексуальной совместимости грибов (рисунок 2), только три из пяти штаммов, ранее морфологически определенных как *Armillaria borealis*, относятся к этому виду. Данные многочисленных европейских работ указывают на то, что ранее данный вид не проявлял агрессивных свойств, однако на территории Сибири он вызывает массовые очаги усыхания хвойных пород, что свидетельствует о необходимости детального исследования свойств сибирских изолятов.



Рисунок 2 – Положительная реакция на скрещивание штаммов опенка осеннего

Современным перспективным направлением в видовой идентификации живых организмов являются молекулярно-генетические методы, включая секвенирование, основанное на сочетании принципов полимеразной цепной реакции с последующим считыванием последовательности нуклеотидов в определенных фрагментах. Один из трех изолятов, видовой принадлежность которого была подтверждена и морфологическим определением, и результатом тест-скрещивания, идентифицировали с помощью метода секвенирования.

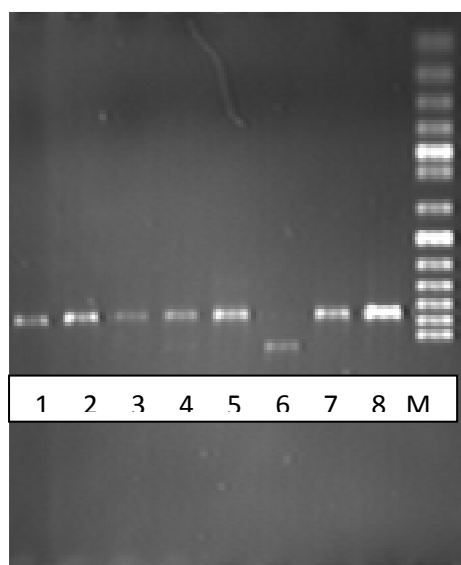
Выделение ДНК осуществляли из свежей культуры гриба с помощью набора реагентов Diatom™ (ООО «Лаборатория Изоген»), согласно протоколу фирмы производителя.

Для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР) использовали набор реагентов GenPak PCA Core (ООО «Лаборатория Изоген») и универсальные праймеры ITS1 F (5-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3) (50 пмоль/мкл); ITS4 R (5-TCCTCCGTTATTGATATGC-3) (56,3 пмоль/мкл). Процесс амплификации проводили в термоциклере, по следующей программе: 1 цикл: денатурация $t=4$ мин, $T=96$ °C; 30

циклов: денатурация $t=1$ мин, $T=96$ °C; отжиг $t=30$ сек, $T=55$ °C; элонгация $t=2$ мин, $T=72$ °C; 1 цикл: элонгация $t=10$ мин, $T=72$ °C; охлаждение реакционной смеси $t=5$ минут, $T=4$ °C.

Электрофоретическое разделение фрагментов ДНК проводили в агарозном геле (2 %). Секвенирование фрагментов ДНК осуществляли с помощью генетического анализатора ABI PRISM 310 (Applied Biosystems) по методике, предложенной фирмой производителем. Интерактивный анализ нуклеотидных последовательностей образцов производили с помощью программы Sequencing Analysis v.6 и Variant Reporter v.2, CLC DNA Workbench v. 6. Результаты секвенирования в формате FASTA использовали для идентификации с помощью баз данных NCBI и Mucobank.

Молекулярно-генетические исследования подтвердили ранее полученные данные о видовой принадлежности исследуемого изолята (рисунок 3). Сравнение сиквенса с генетической базой данных позволило достоверно определить его вид как *Armillaria borealis*. Эти данные свидетельствуют о том, что трудоемкие и длительные по времени классические методы видовой идентификации могут быть успешно заменены на генетические, как более точные и быстрые.



```
GTGCCTTCGTAGGTGACCTGCGGAGGATCATTATTGAAACTT
GAATCGTAGCATTGAGAACTGTTGCTGACAGGTAAGGGTA
TGTGCACGTTTCGACGTGTTGCGTTCTAAACATCCACSTGTGC
ACSTTTGTAGACTTGATTAACSTTTTCGCTCTCGAGCGGTTAGA
AGGGTTGCTTTTCGATCCTCTCAAAAAACTATCAAGTCTATGT
СТАТАААТСТТТГТАТГТСТАГААТГТСТТГТТТАТГГГАС
GCAAGTCTTTAAATCTTATACAACTTTCAACAACGGATCTC
TTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAA
СТААТГТГААТТГСАГААТТСАГТГААТСАТСАГТСТТТГА
ACGCACCTTGCGCCCTTTGGTATTCCGAAGGGCATGCSTTTT
TTGTTTTGTCATTAААТТСТСААСТССССТТСТТТСАТТАГГ
AGTGCGGCGGATTGGATATGGGGGTTTGCTGGTTTCTAACGA
AATCAGCTCCTCTGAAATGCATTAGCAGAAACCGTTTGACTC
TGGCTGCTAGGCTGTGATAATATCTACGCSTTGGTAGTTGGG
TCGGAATACGAGTACATACAGTGGTAACTAATCAGGCTTTTCA
GTCTGGCTTAGGATTGGTTTGGAGGTGCTTAACGGCTCCTTC
TGCTTTCTCCSTTTGCGGAGATACTTGTCCGATTCTAAGAGA
GGAGTTGCTTAGCGCGAGCTTAGCTTTCSTTGATTTTTCCSTT
GACTTTGTAGAAGGATTCAGCTTCTAACCGTCCATTGACTTG
GACAATTTATTGACTATGTGGACCTCACATCAGGAAGGACTA
CCCCTGAACTTCAAGCATCATCAATAAGCCGGAGGAAGA
```

Рисунок 3 – Слева – электрофореграмма ПЦР-продуктов (все, кроме 6) ДНК *Armillaria borealis*; М – маркер молекулярного веса (снизу вверх): 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 250, 200, 150, 100, 50 п.н. Справа – нуклеотидная последовательность *Armillaria borealis*.

В ходе видовой идентификации собранных плодовых тел опенка осеннего, один из изолятов был определен как *Armillaria borealis* Marxm. & Korhonen с использованием трех методов определения, еще 2 изолята – с помощью двух методов. Полученные результаты свидетельствуют в пользу имеющегося в литературе мнения об активном участии данного вида в образовании очагов усыхания хвойных и лиственных пород деревьев на территории Сибири. Молекулярно-генетические данные видового определения исследуемого вида опенка осеннего полностью соответствуют данным его классической идентификации, что указывает на их перспективность для проведения ранней и быстрой диагностики заболеваний древесных растений, вызываемых комплексом *Armillaria mellea s.l.*