

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ БЕЛОЙ ЗАБОЛОННОЙ ГНИЛИ КОРНЕЙ ЛЕСНЫХ ПОРОД

In work the basic methods of identification of activators white decays of roots of wood breeds in field and laboratory conditions are considered.

Проблема определения и диагностики вида относится к сложнейшим в современной микологии. У возбудителей белой заболонной гнили корней – грибов рода *Armillaria* эта проблема обостряется широким морфологическим разнообразием плодовых тел в зависимости от региона и субстрата произрастания, что затрудняет составление четких определителей. К тому же плодовые тела у грибов этого рода появляются один-два раза в году на довольно короткий промежуток времени (1–2 недели в пределах одного субстрата), что не позволяет определять вид патогена в течение всего периода вегетации. Тем не менее определение видовой принадлежности грибов рода *Armillaria*, распространенных на том или ином участке леса, особенно при планировании лесокультурных работ, принципиально важно, т. к. одни из них являются безвредными сапротрофами, а другие опасными патогенами хвойных и лиственных пород. Перечисленные факторы привели нас к необходимости поиска и разработки эффективных и по возможности простых методов диагностики видов *Armillaria*.

В этих целях нами были опробованы следующие методы определения видовой принадлежности данной группы грибов:

- макроморфологический;
- микроморфологический;
- биометрический;
- растительных тестов;
- биохимический;
- экологический.

Наиболее распространенный метод определения видовой принадлежности представителей рода *Armillaria* базируется на половой и вегетативной несовместимости изолятов, принадлежащих к различным биологическим видам. В результате тестирования более 400 гаплоидов и диплоидов *Armillaria*, собранных в различных геоботанических округах, нами было впервые выявлено на территории республики четыре вида этого рода фитопатогенных грибов (*A. borealis*, *A. ostoyae*, *A. cepistipes*, *A. gallica*). Однако данные методы идентификации изолятов рода *Armillaria* проблематичны, поскольку предполагают наличие карпофоров, занимают много времени (около 10 недель с момента получения образца) и требуют значительного опыта. Эти недостатки привели к поиску и интенсивному развитию других методов диагностики видов *Armillaria*, в том числе и молекулярных.

В наших исследованиях была предпринята попытка дифференциации белорусской популяции видов *Armillaria* по наличию изоформ пероксидазы и фенолоксидазы. Электрофоретические спектры этих ферментов у видов *Armillaria* не отличались большим количеством изоформ. Однако обнаруженные изоформы являются специфичными для каждого вида вне зависимости от происхождения, места взятия и возраста образца, что подтверждает их диагностическую ценность.

A. cepistipes и *A. gallica* наследуют пероксидазу с Rf 0.17, в чем проявляется их родство, и в то же время *A. gallica* выделяется присутствием характерной только для него изоформы пероксидаз с Rf 0.21. При использовании данного буфера и системы электрофоретического разделения не выявлено ни одной изоформы пероксидаз у *A. ostoyae*, что также может являться диагностическим признаком. Следует отметить, что экспрессия пероксидаз у изучаемых объектов низкая.

Спектры фенолоксидаз мицелия грибов рода *Armillaria* отличаются большей гетерогенностью. Хотя спектры *A. cepistipes*, *A. ostoyae* и *A. borealis* имеют одинаковое число изоформ, эти изоферменты отличаются друг от друга своей молекулярной массой. Так, *A. borealis* демонстрирует присутствие фенолоксидаз с Rf 0.66 и 0.72; *A. cepistipes* – Rf 0.63 и 0.72. *A. ostoyae* обладает уникальным геномом, показывая специфические, нехарактерные для других видов фенолоксидазы (Rf 0.74 и 0.80). В спектре *A. gallica* выявлены изоформы фенолоксидаз с Rf 0.63; 0.66; 0.72; 0.73. Полученные результаты позволяют сделать выводы о пригодности данных методик для быстрой идентификации (2–3 дня) видовой принадлежности изолятов *Armillaria*. К недостаткам этого метода можно отнести его техническую сложность и необходимость сложного оборудования и высококвалифицированного научного персонала.

Размеры и форма спор – генеративных клеток, развивающихся в наиболее благоприятное для организма время и минимально подверженных воздействию факторов внешней среды, издавна используются в таксономии. Однако, по данным различных исследователей, средние размеры спор представителей рода *Armillaria* существенно варьируют. Для нас значительный интерес представляло определение средних размеров базидиоспор белорусских популяций

видов *Armillaria* и выявление возможности их использования в целях идентификации представителей этого рода.

Для определения индивидуальных различий в размерах и форме популяций базидиоспор, встречающихся в Беларуси *A. borealis*, *A. ostoyae*, *A. cepistipes* и *A. gallica*, были отобраны 112 споровых отпечатков из плодовых тел, собранных в различных геоботанических подзонах страны. Из каждого спорового отпечатка измеряли 50 спор при помощи окуляр-микрометра при увеличении в 1000 раз.

Полученные данные показывают, что средние размеры базидиоспор в зависимости от вида *Armillaria* варьируют незначительно. Индекс формы спор (отношение длины к ширине) у видов *A. borealis*, *A. ostoyae* и *A. cepistipes* практически идентичен (1,58; 1,55; 1,57 соответственно). В то же время отношение длины к ширине у спор *A. gallica* несколько выше и равняется 1,66. Следовательно, споры *A. gallica* имеют немного более вытянуто-эллипсоидную форму. Показатель, дающий представление о точности определения средней арифметической, в подавляющем большинстве случаев выполнял условие $P < 2\%$, что говорит о достаточно высоком качестве проведения опыта.

Степень достоверности различия средних размеров базидиоспор видов определяли при помощи критериев Фишера (*F*-критерий) и Стьюдента (*t*-критерий) путем попарного сравнения. При используемом в биологии пороге доверительной вероятности ($P = 0,95$), нулевую гипотезу нельзя отвергнуть во всех случаях: наблюдаемую разницу в средних размерах базидиоспор видов *Armillaria* следует считать статистически недостоверной.

Таким образом, результат межвидовых сравнений свидетельствует об отсутствии видоспецифичности в размерах и индексах формы базидиоспор у четырех встречающихся в Беларуси представителей рода *Armillaria*. Можно с уверенностью утверждать о невозможности использования этого признака для идентификации местных популяций *A. borealis*, *A. ostoyae*, *A. cepistipes* и *A. gallica*.

Морфологические различия строения вегетативного мицелия, выращенного в чистых культурах на различных питательных средах, часто используется исследователями для диагностики вида у грибов. Проведенное нами изучение морфологии и скорости роста гаплоидных изолятов *Armillaria in vitro* не позволило выделить четкие диагностические признаки для каждого представителя этого рода. Гаплоиды всех видов предельно варьировали по скорости роста, цвету и текстуре колоний, обилию ризоморф, их типу и ветвлению.

Диплоидный мицелий обладал дискриминирующими свойствами в несколько большей сте-

пени. Лучше всего из рассматриваемой группы выделялись изоляты *A. cepistipes*. На используемой питательной среде в подавляющем большинстве случаев крустовые колонии этого гриба выделяли в среду красящий пигмент красновато-коричневого цвета, который отсутствовал у изолятов других видов. Кроме того, изоляты *A. cepistipes* отличались самой высокой скоростью роста поверхностного мицелия и ризоморф, которые образовывались у всех изолятов. Ветвление ризоморф *A. cepistipes* всегда моноподиальное. Инфекционные структуры этого вида имели чаще всего цилиндрическую форму и относительно небольшой диаметр (до 1 мм).

Изоляты *A. gallica* обладали поверхностным мицелием, сходным таковому *A. ostoyae* и *A. borealis*, и отличались лишь отсутствием воздушного мицелия поверх крустовой подложки. Колонии *A. gallica* характеризовались обширными гладкими крустовыми зонами, занимающими все пространство чашки, а также тонкими многочисленными ризоморфами, густо приподнимающимися над субстратом. Развитие же необильного светло-коричневого воздушного мицелия указывало на принадлежность изолята к виду *A. ostoyae* или *A. borealis*. Колонии изолятов этих видов имели сходную морфологию. Признаков дальнейшего разграничения пары данных видов нами обнаружено не было. Таким образом, морфологические особенности вегетативного мицелия, выращенного в чистых культурах на сусло-агаре, могут служить для диагностики только двух из четырех видов *Armillaria*, встречающихся в насаждениях республики.

Одними из основных критериев определения вида у базидиальных грибов являются макроморфологические признаки плодовых тел. Карпофоры грибов рода *Armillaria* отличаются чрезвычайным варьированием по размерам, форме, окраске и т. д., что затрудняет составление определителей и работу с ними. В этой связи финский исследователь К. Korhonen предложил определять видовую принадлежность базидиом путем сравнения со сделанными им фотографиейми характерных плодовых тел каждого вида [1]. М.Г. Радиевская [2], сравнивая базидиомы *A. cepistipes*, *A. borealis* и *A. mellea*, собранные в Подмосковье, вообще пришла к отрицанию возможности выделения их визуальных отличий. В большинстве случаев плодовые тела из одного сростка сочетали в себе характерные черты двух или даже трех видов. Она предположила, что комбинация традиционных таксономических признаков у видов рода *Armillaria* происходит независимо друг от друга, а на облике плодовых тел сказывается не столько принадлежность к тому или иному виду, сколько условия обитания его представителей, включающие характер субстрата, его ув-

лаженность, уровень инсоляции и пр. К аналогичному выводу пришли также G.A. Kile и R. Watling [3], изучавшие вопросы влияния среды на морфологию базидиом австралийского вида *A. luteobubalina*. Однако большинство микологов [1, 4, 5] придерживаются морфологической концепции видов у *Armillaria*. По их мнению, среди макропризнаков, обладающих повышенной ценностью в дифференцировке видов у *Armillaria*, важнейшими являются: цвет шляпки, присутствие, обилие и распределение чешуек на шляпке, форма и сохранность кольца на ножке, размер шляпки, длина и форма ножки. На наш взгляд, среди этих признаков преобладают количественные.

Морфологическое разнообразие плодовых тел изучалось нами в 32 лесхозах, расположенных во всех геоботанических подзонах страны. Измерению и описанию было подвергнуто более 500 зрелых плодовых тел грибов рода *Armillaria*. Видовая принадлежность каждого плодового тела была определена при помощи метода половой несовместимости. Проведенные исследования подтвердили чрезвычайное варьирование плодовых тел грибов рода *Armillaria* по размерам, форме, окраске. Базидиомы *A. ostoyae* и *A. gallica* выделяются характерным булавовидным утолщением у основания ножки и более тонким прерывистым кольцом. Чешуйки на поверхности шляпки *A. gallica* имеют пирамидальную форму и располагаются концентрично. *A. gallica*, *A. borealis* и *A. cepistipes* имеют цилиндрическую или слегка утолщающуюся к основанию ножку. *A. cepistipes* характеризуется гладкой с редкими чешуйками поверхностью шляпки. Видовые отличия плодовых тел изучаемых грибов более явно выражены в морфологии поверхности шляпки, кольца и в строении нижней части ножки.

Исследования инфекционных структур *Armillaria* в почве показали, что размеры ризоморф варьировали по видам грибов. Опираясь на морфологические особенности этих структур, все встречающиеся в республике макромицеты рода *Armillaria* можно условно разделить на две группы. Представители первой имеют крупные (до 5 мм диаметром), как правило, черные и редко ветвящиеся почвенные ризоморфы, радиально расходящиеся во все стороны от питательного субстрата на глубине 5–15 см. Тип ветвления этих ризоморф всегда моноподиальный. К этой группе относятся *A. borealis* и *A. ostoyae*. Ризоморфы второй группы отличались небольшим диаметром (до 2 мм) и частым дихотомическим ветвлением. Такие ризоморфы обычно имели темно-коричневую окраску. Располагались они в виде паутины под лесной подстилкой вокруг колонизированного грибом субстрата. Подобные инфекционные структуры образовывали *A. gallica* и *A. cepistipes*. Количество

почвенных ризоморф значительно изменялось в зависимости от возраста, состава насаждения, типа лесорастительных условий и колебалось в пределах от 4 до 30 кг абсолютно сухой массы на гектаре. Хотя выявленные особенности и не позволяют четко различать один вид от другого, однако могут в совокупности с другими показателями (морфология плодовых тел и вегетативного мицелия *in vitro*, приуроченность к субстрату, распространенность, патогенность и т. д.) служить для диагностики представителей этого сложного комплекса.

Экологические методы идентификации видов грибов основываются на выявлении их приуроченности к субстрату и почвенно-типологическим условиям. Развитие грибов рода *Armillaria* было установлено на 30 видах деревьев и кустарников. Наблюдается специализация у трех из четырех видов *Armillaria* по группам древесных пород. Плодовые тела и подкорковый мицелий *A. ostoyae* в подавляющем большинстве случаев (80,8%) встречались на хвойных породах. На сосне обыкновенной было обнаружено 58% сборов, на ели европейской – 18%. На древесине лиственных пород *A. ostoyae* встречался значительно реже. Все случаи были зафиксированы в смешанных хвойно-мягколиственных насаждениях с незначительным содержанием последних или в дубравах. Изоляты гриба, встречающиеся на древесине мягколиственных пород, развиваются сапротрофно. Лишь несколько экземпляров гриба, развивающихся на деревьях дуба, предварительно сильно ослабленных, находились в паразитической фазе развития, тогда как на хвойных породах практически все изоляты *A. ostoyae* развиваются как патогены, вызывая одиночное или мелкогрупповое отмирание деревьев сосны и групповое отмирание ели.

Грибы *A. cepistipes* и *A. gallica* произрастают только на древесине лиственных пород. Примерно одна четверть изолятов этих видов встречалась на твердолиственных породах и три четверти – на мягколиственных. Если учесть, что лесные земли республики, покрытые твердо- и мягколиственными породами, соотносятся как 1:8,5 [6], можно предположить предпочтение данными видами базидиомицетов древесины твердолиственных пород.

A. borealis можно считать омниваром, так как этот организм поселяется на большом числе видов, принадлежащих к различным семействам. В насаждениях республики гриб способен развиваться на 26 древесных породах. Встречаемость *A. borealis* на хвойных деревьях несколько ниже, чем на лиственных. С древесины последних было собрано 66,8% изолятов гриба, из них 11,1% – на твердолиственных и 52,7% – на мягколиственных породах.

Изучая встречаемость видов *Armillaria* в лесных фитоценозах нашей страны, выявили широкую распространенность грибов, их способность развиваться в насаждениях, произрастающих в условиях с различной влажностью и богатством почвы. В то же время установлено, что каждый из этих грибов предпочитает только некоторые типы условий произрастания. *A. borealis* чаще всего выявлялся в условиях свежей дубравы (36,4%), т. е. в ельниках, дубравах и ольшаниках кисличного типа леса. 29,9% изолятов этого гриба встречались в свежих судубравах (сосняки и березняки кисличные, ельники и дубравы орляковые) и 13,5% изолятов было обнаружено в условиях влажной субори (сосняки, ельники, осинники и ольсы черничного типа леса). Встречаемость гриба возрастает с увеличением богатства почвы и резко снижается с увеличением увлажненности. Так, если в свежих условиях находились 75,9% изолятов *A. borealis*, то во влажных уже 21,2%, а в сырых только 2,9% изолятов.

A. ostoyae предпочтительно развивался в свежих хвойно-лиственных насаждениях и несколько менее в свежих судубравах, практически полностью игнорируя дубравы. Так, в условиях субори было обнаружено 48,1% изолятов *A. ostoyae*, в судубравах 37,1%, а в дубравах лишь 4,9% изолятов. К тому же около 10% изолятов гриба было выявлено в условиях свежих и влажных песчаных почв (A_2-A_3). Широкая распространенность этого базидиомицета в бедных лесозафаических условиях объясняется, по-видимому, его приуроченностью к хвойным породам и особенно к сосне, насаждения которой произрастают именно на песчаных и супесчаных почвах. Наиболее предпочитаемыми *A. ostoyae* являлись смешанные хвойно-лиственные насаждения вересковых, мшистых и орляковых типов леса.

A. cepistipes и *A. gallica* имеют сходную встречаемость в различных эдафотонах. В условиях дубравы было обнаружено 48,1% от всех изолятов *A. cepistipes* и 44,1% *A. gallica*, в условиях субори лишь 6,2% и 20,6% соответственно. О том, что эти виды избегают насаждений, произрастающих в бедных почвенно-грунтовых условиях, говорит и тот факт, что ни один изолят данных грибов не был найден в условиях бора. Кроме того, *A. cepistipes* и *A. gallica* отличались от двух первых видов более высокой гигрофильностью. В насаждениях,

произрастающих на влажных и сырых почвах, было выявлено 24,7% *A. cepistipes* и 38,2% *A. gallica*. Данную ситуацию можно объяснить предпочтительным развитием этих видов на древесных породах, требовательных к содержанию в почве питательных веществ и влаги.

Таким образом, грибы рода *Armillaria* встречаются практически во всех почвенно-грунтовых условиях. *A. borealis*, *A. cepistipes* и *A. gallica* отдают предпочтение судубравам и дубравам (C_2-C_3 , D_2-D_3). *A. ostoyae* чаще встречается в субориях (B_2), что обусловлено распространением предпочитаемой породы-хозяина, то есть сосны обыкновенной. Общим для всех видов является избегание условий местопроизрастания, занимающих крайние положения в эдафо-фитоценотическом ряду. В чрезмерно сухих и бедных условиях грибы не имеют достаточного количества питательного субстрата. Распространение видов *Armillaria* на торфяно-болотных почвах сдерживает отсутствие способности у этих грибов развивать свои основные инфекционные структуры – ризоморфы в условиях чрезмерного увлажнения.

На базе выявленных различий в морфологии карпофоров и ризоморф данных видов, различий в их географической и экологической специализации составлен определитель «местных» популяций грибов рода *Armillaria*.

Литература

1. Korhonen K. Interfertility and clonal size in the *Armillariella mellea* complex // *Karstenia*. – 1978. – Vol. 18. – P. 31–42.
2. Радзиевская М.Г. Структура комплекса *Armillaria* на территории СССР: Автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.24 / Моск. гос. ун-т. – М., 1986. – 23 с.
3. Kile G.A., Watling R. An expanded concept of *Armillaria luteobubalina* // *Transactions of the British Mycological Society*. – 1981. – Vol. 77. – P. 75–83.
4. Volk T.J., Burdsall H.H. The state of taxonomy of the genus *Armillaria* // *McIlvainea*. – 1993. – № 11. P. 4–11.
5. Romagnesi H. Observations sur les *Armillariella*, II // *Bulletin de la Societe Mycologique de France*. – 1973. – Vol. 89. – P. 195–206.
6. Государственный лесной фонд Республики Беларусь: Сводные материалы / Ком. лесн. хоз-ва при Совете Министров РБ. ЛРУП «Белгослес». – Минск, 2003. – 91 с.