

В. Б. Звягинцев, А. А. Ленец *

Белорусский государственный технологический университет, г. Минск;

** Центральный ботанический сад НАН Беларуси, г. Минск*

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ВИДОВ *ARMILLARIA* ПРИ ПОМОЩИ СРАВНИТЕЛЬНОГО АНАЛИЗА СПЕКТРОВ ИЗОФОРМ ПЕРОКСИДАЗ И ФЕНОЛОКСИДАЗ

Проблема определения и диагностики вида относится к сложнейшим в современной микологии. Для фитопатогенных грибов, к которым принадлежат возбудители корневой гнили древесных растений *Armillaria* (комплекс опенка осеннего), решение этой проблемы имеет не только теоретическое, но и прикладное значение. Комплекс *Armillaria* лишь недавно был разделен на виды. Широкое морфологическое разнообразие плодовых тел каждого из них в зависимости от региона и субстрата произрастания 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 патогенна в течение всего периода вегетации. До недавнего времени для определения вида исследователи использовали методы, основанные на соматической несовместимости выращиваемых совместно колоний дикого гаплоидного изолята и гаплоидного тестера с последующей визуальной оценкой результатов скрещивания [1; 2]. Однако традиционный метод, применяемый для идентификации изолятов *Armillaria* проблематичен, поскольку предполагает наличие карпофоров, занимает много времени (около 10 недель с момента получения образца) и требует значительного опыта. Эти проблемы привели к поиску и интенсивному развитию других методов диагностики *Armillaria*, в т. ч. и молекулярных [3; 4].

Быстрым и легко воспроизводимым молекулярным методом идентификации видов является анализ изозимов. Для исследований видов *Armillaria* анализ изозимов с различным успехом использовался с конца 80-х годов [5; 6]. Однако до настоящего времени не создана полноценная база данных, облегчающая идентификацию видов комплекса опенка осеннего.

В наших исследованиях предпринята попытка дифференциации четырех белорусских видов *Armillaria* (*A. cepistipes*, *A. ostoyae*, *A. borealis* и *A. gallica*) по наличию изоформ пероксидазы и фенолоксидазы.

Мицелий выращивали в чашках Петри на агаризованном пивном сусле (плотность по сахару 6°) в течение 21 дня. Экстракцию пероксидаз проводили трис-глициновым буфером с pH 8.3. Электрофоретическое разделение осуществляли в нативной щелочной ПААГ-системе [7]. Для выявления в геле пероксидаз в качестве хромогенного реагента использовали бензидин, субстратом выступала перекись водорода. При обнаружении фенолоксидаз грибов, бензидин выступал в роли и хромогенного реагента, и субстрата данных ферментов [8].

Полученные результаты указывают, что электрофоретические спектры пероксидаз разных видов *Armillaria* не отличались большим количеством изоформ. В то же время каждый вид грибов имеет собственный специфический набор пероксидаз (таблица). *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 так же может являться диагностическим признаком. Следует отметить, что экспрессия всех изоформ пероксидаз у изучаемых объектов низкая.

Таблица

Изоформы пероксидаз и фенолоксидаз видов *Armillaria*

Вид <i>Armillaria</i>	Rf изоформ	
	пероксидаз	фенолоксидаз
<i>A. borealis</i>	0.09	0.66; 0.72
<i>A. ostoyae</i>	—	0.74; 0.80
<i>A. cepistipes</i>	0.17	0.63; 0.72
<i>A. gallica</i>	0.17; 0.21	0.63; 0.66; 0.72; 0.73

В отличие от изоформных спектров пероксидаз мицелия грибов рода *Armillaria*, спектры фенолоксидаз отличаются большей гетерогенностью. Геном *A. cepistipes*, *A. ostoyae* и *A. borealis* характеризуется наличием генов, кодирующих две фенолоксидазы. В геноме *A. gallica* экспрессируются гены четырех фенолокси-

даз. Хотя спектры *A. cepistipes*, *A. ostoyae* и *A. borealis* имеют одинаковое число изоформ, но эти изоферменты отличаются друг от друга по своей молекулярной массе. 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 ни для одного другого вида 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* в отсутствие плодовых тел. Это ускорит работу по определению ареала каждого вида в пределах республики и выявлению их вредоносности.

1. Shaw G. III, Kile A. *Armillaria* root disease. Agriculture Handbook No. 691. Washington, U. S. A.: USDA Forest Servis, 1991.
2. Fox R. T. F. *Armillaria* root rot: Biology and control of honey fungus. Andover: Intercept, 2000.
3. Schulze S. et al. Identification techniques for *Armillaria* spp. and *Heterobasidion annosum* root and butt rot diseases // *Journal of Plant Diseases and Protection*. 1997. Vol. 104. P. 433—451.
4. Schulze S end Bahnweg G. Critical review of identification techniques for *Armillaria* spp. and *Heterobasidion annosum* root and butt rot diseases // *Journal of Phytopathology*. 1998. Vol. 146. P. 61—72.
5. Lin D., Dumas M. T., Hubbes M. Isozyme and general protein patterns of *Armillaria* spp. collected from the boreal mixedwood forest of Ontario // *Canadian Journal of Botany*. 1989. Vol. 67. P. 1143—1147.
6. Mwenje E., Ride J. P. The use of pectic enzymes in the characterization of *Armillaria* isolates from Africa // *Plant Pathology*. 1997. Vol. 46. P. 341—354.
7. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature*. 1970. V. 227. P. 680—685.
8. Чаянова С. С., Хавкин Э. Е. Использование нейтрального полиакриламидного геля для изоферментного анализа пероксидаз и эстераз // *Физиология растений*. 1990. Т. 37. Вып. 5. С. 1037—1039.

Б