

Т.В. ЦИКУН<sup>1</sup>, С. ПРОСПЕРО<sup>2</sup>

<sup>1</sup> ДВНЗ «Ужгородський національний університет»  
вул. Волошина, 32, Ужгород, 88000, Україна  
tania\_tsikun@yahoo.com

<sup>2</sup> Швейцарський федеральний науково-дослідний інститут ВСЛ,  
відділ популяційної генетики і фітопатології  
Цюріхштрасе, 111, Бірменсдорф, СН 8903, Швейцарія  
simone.prospiero@wsl.ch

## МОЛЕКУЛЯРНО-ФІЛОГЕНЕТИЧНИЙ АНАЛІЗ ВИДІВ РОДУ *ARMILLARIA* (FR.) STAUDE ( *PHYSALACRIACEAE*), ВИЯВЛЕНИХ В УКРАЇНІ

*Ключові слова:* опеньок, PCR–RFLP, нуклеотидні послідовності, філогенетичний аналіз

### Вступ

Види роду *Armillaria* (Fr.) Staude – широко розповсюджена група ксилотрофних базидіоміцетів лісових екосистем. Окремі види даного роду виявляють фітопатогенні властивості, зумовлюючи білу гниль деревних і чагарникових рослин, інші – існують сапротрофно та забезпечують мінеральний кругообіг у лісовому біогеоценозі (Shaw et Kile, 1991). Практичне визначення видів роду *Armillaria* за морфологічними ознаками ускладнене високою подібністю базидіом видів (Roll-Hansen, 1985; Marxmüller, 1992; Antonin et al. 2009). Видове визначення наразі здійснюють переважно молекулярними методами. Найпоширенішим із них є аналіз нуклеотидних послідовностей або PCR–RFLP аналіз IGS–1, ITS1–5.8S–ITS2 ділянок рибосомної ДНК та фрагмента гена EF–1 $\alpha$ . Дотепер в Україні не здійснювались молекулярні дослідження цих грибів і було зареєстровано лише два їхні види: *Armillaria mellea* (Vahl) P. Kumm. і *A. tabescens* (Scop.) Emel (Андріанова та ін., 2006).

### Матеріали і методи досліджень

Для молекулярної характеристики видів роду *Armillaria* використано 452 зразки ДНК і 184 нуклеотидні послідовності. Із цих ДНК-зразків 434 було виділено з ризоморфного міцелію, базидіом або моноспорових чистих культур зразків, виявлених в Україні. Збір матеріалу для досліджень здійснювався на території Закарпатської і Рівненської областей, Кримського півострова (Ангарський перевал), м. Харкова та м. Дніпропетровська.

Молекулярні дослідження включали аналіз поліморфізму фрагментів полімеразно-ланцюгової реакції, рестрикційних фрагментів (PCR–RFLP) і нуклеотидних послідовностей ділянок рибосомної ДНК – першого зовнішнього міжгенного спейсера (IGS–1), першого та другого внутрішніх міжгенних спейсерів і гена 5.8S (ITS1–5.8S–ITS2), а також протеїн-кодуючого фрагмента гена

Elongation factor 1-alpha (EF-1alpha). Усі молекулярні лабораторні аналізи здійснювалися на базі Швейцарського федерального інституту досліджень ВСЛ (Swiss Federal Research Institute WSL). Отримані послідовності порівнювали з послідовностями зразків з Північної півкулі відповідних видів, які містяться у базі даних загального доступу GenBank (Benson et al., 1982), а також із послідовностями, отриманими від тестових культур п'яти європейських видів: A1, A2, A5 – *Armillaria borealis* Marxmuller et Korhonen, B2, B3, B5 – *A. cepistipes* (Velenovsky); C2, C4, C5 – *A. ostoyae* (Romagnesi) Herink; D1, D4, D5 – *A. mellea* (Vahl:Fr.) Kummer; E4, E5, E6 – *A. gallica* Marxmüller et Romagnesi. Тестові культури надані з мікологічної колекції Інституту ВСЛ; вони є вегетативною копією оригінальних тестових штамів J.J. Guillaumin (INRA, Clermont-Ferrand, France).

**ДНК виділяли** за СТАВ протоколом (Gardes et Bruns, 1993) із ліофілізованих 30 г ризоморфного міцелію, базидіоми чи з 15 г міцелію чистих культур. ДНК ресуспендувалось у 50 мкл ТЕ буферного розчину (10 мМ Tris-HCl, 1 мМ ЕДТА, рН 8.0).

**PCR ампліфікація** трьох ділянок ДНК здійснювалася за допомогою праймерів: IGS-1-LR12R і O-1 (Veldman et al., 1990; Gardes et al., 1993); ITS1-5.8S-ITS2 – ITS1 і ITS4 (White et al., 1990); для EF-1alpha – EF595F і EF1160R (Maphosa et al., 2006) – у 50 мкл об'єму з концентраціями компонентів: 1х стандартного буферного розчину (Sigma), 4 мМ MgCl<sub>2</sub>, 100 мкМ дНТФ (Promega), 0.2 мг/мл BSA (Fermentas), 20 пмоль кожного праймеру (10 пмоль для ITS праймерів), 2.5 акт. од. Таq ДНК полімерази (Sigma) і 50 нг ДНК-зразка у вільній від нуклеаз воді. Умови інкубації для IGS-1 і ITS1-5.8S-ITS2: 95 °С – 2 хв, 35 повторень: 95 °С – 30 с, 58 °С – 30 с, 72 °С – 2 хв і кінцева елонгація протягом 30 хв за 72 °С. PCR програма для EF-1alpha регіону: 94 °С – 2 хв, 33 повторення: 94 °С – 30 с, 55 °С – 30 с, 72 °С – 2 хв і 72 °С – 30 хв. Усі ампліфікації здійснювалися за допомогою PTC-100® Thermal Cycler (Bio-Rad Inc., США). Успішність PCR-ампліфікації і довжина отриманих фрагментів ДНК перевірялись у 1,5%-ному горизонтальному агарозному гелі, отриманому після електрофорезу при 99 В/см протягом 40 хв.

**RFLP аналіз** PCR ампліконів здійснювався з рестриктазами: *AluI*, *HincII* (*HindII*), *MvaI*269 I (*BsmI*) і *NdeI*, *HinfI* et *MboI* за інструкцією виробника (Fermentas). Довжина фрагментів ендонуклеазної рестрикції визначалась у 3%-ному горизонтальному агарозному гелі після електрофорезу при 99 В/см протягом 55 хв. Довжина вважалась ідентичною описаній у літературі за умови похибки до ± 10 п.о.

**Секвенування** проводили за допомогою автоматичного секвенатора ABI PRISM 3100 (Applied Biosystems, США), після послідовної підготовки зразків із наборами Mini Elute Columns (Qiagen, Велика Британія), Big Dye Terminator Cycle Sequencing Reaction v3.1 Kit (Applied Biosystems, США), DTR Gel Filtration Cartridges (Edge BioSystems) за протоколами виробників. Обробку й аналіз отриманих послідовностей проводили за допомогою програм GeneStudio (TM) Professional Edition Version 2.1.2.3. і MEGA4.

**Філогенетичний аналіз** здійснювався за нуклеотидними послідовностями методом максимальної економії (ME). Множинне вирівнювання послідовностей виконували за алгоритмом ClustalW. Як організм «поза групою» (outgroup) задіяний *Heterobasidion annosum* (GenBank: JN657444, JN657471, JN657498). ДНК послідовності, використані для побудови філогенетичних дендрограм, і їхні GenBank номери представлені в табл. 1.

### Результати досліджень та їх обговорення

**PCR–RFLP аналіз** трьох ділянок геному *Armillaria* успішно здійснений для 452 зразків, його результати наведено в табл. 2. Довжини продуктів PCR були однакові в усіх виявлених видів лише для EF–1alpha (586 п. о.).

PCR–RFLP аналіз ділянки IGS–1 з набором із чотирьох ензимів (табл. 2) показав такі основні результати: у виду *A. tabescens* цей ДНК регіон значно коротший (840 п. о.), аніж в інших – 875–907 п. о., а в разі розщеплення *AluI* рестриктазою проявляється видоспецифічний профіль із двох фрагментів – 422 п. о. і 235 п. о.; частина зразків *A. ostoyae*, зокрема тестові чисті культури, не мають сайта рестрикції для ендонуклеази *BsmI*, і це унеможливило їх відокремлення від зразків *A. borealis*, як описано в літературі (Harrington *et* Wingfield, 1995; Pérez Sierra *et al.*, 1999). Проте, на відміну від інших, види *A. ostoyae* – *A. borealis* мають сайт рестрикції для ендонуклеази *NdeI* (профіль  $\approx$  550 п. о. і 360 п. о.). Усі зразки *A. mellea* і деякі *A. ostoyae* після розщеплення регіону IGS–1 рестриктазою *MvaI*269I (*BsmI*) проявляють профіль із двох фрагментів  $\approx$  567 п. о., 308 п. о. і  $\approx$  620 п. о. і 287 п. о. відповідно, тоді як *A. gallica* і *A. cepistipes* не мають сайта рестрикції для цього ензиму. Крім того, IGS–1 ДНК-амплікони тестової культури *A. cepistipes* і двох наших диплоїдних ізолятів показали новий профіль RFLP (584 п. о. і 194 п. о.) і тестовий штам *A. gallica* E4 (377 п. о., 182 п. о., 257 п. о.). Два додаткові профілі ідентифіковані в цьому регіоні для *A. cepistipes* при розщепленні рестриктазою *AluI*, які в сумі давали довжину вдвічі більшу, ніж амплікон PCR, і є комбінацією профілів, виявлених нами (табл. 2, *A. cepistipes* RFLP тип 2, 3, 6) та іншими дослідниками (Harrington, Wingfield, 1995; Pérez Sierra *et al.*, 1999). Крім того, в цьому регіоні було зафіксовано міжвидову комбінацію профілів RFLP від 38 зразків, які належать до двох близькоспоріднених видів: *Armillaria gallica* – *A. cepistipes*.

PCR–RFLP аналіз регіону ITS1–5.8S–ITS2 здійснювався з ензимами: *HinfI* і *MboI* (табл. 2). Розщеплення рестриктазою *MboI* виявило відмінні профілі RFLP для близькоспоріднених видів *Armillaria borealis* – два фрагменти, а *A. ostoyae* – від трьох до п'яти фрагментів понад 100 п. о. Крім того, ми зафіксували два нових профілі для *A. ostoyae* (табл. 2, тип 1 і 4). Подібно до результатів у IGS–1 регіоні рДНК шість зразків показали міжвидові варіації отриманих фрагментів ендонуклеазної рестрикції для *Armillaria gallica* – *A. cepistipes*.

Одержані дані рестрикційного розщеплення ензимом *AluI* ампліфікованого регіону гена EF–1alpha відокремили зразки *Armillaria gallica*, які походять з європейського континенту, від інших виявлених видів цього роду і зразків *A. ga-*

Таблиця 1. *Armillaria* ДНК послідовності

Походження ДНК / Країна	Ізолят	Послідовності		
		IGS-1	ITS1-5.8S-ITS2	EF 1-alpha
1	2	3	4	5
<i>A. tabescens</i>				
Гаплоїдна культура / Японія	96_3_3	AB510824	AB510868	AB510805
Гаплоїдна культура / Японія	96_1_8	AB510823	AB510867	AB510804
Гаплоїдна культура / Україна	HA1S5	HQ232284	HQ232292	HQ285906
Гаплоїдна культура / Україна	HA2S5	HQ232285	HQ232293	HQ285907
Гаплоїдна культура / Україна	HA5S3	HQ232286	HQ232294	HQ285908
США	CMW3158	AY773966		DQ435641
Франція	CMW3165			DQ435642
Базидіома / США	OOI-99	AY509192	AY213589	
Базидіома / США	OOI-210		AY213590	
Базидіома / Сербія	Qrob Subot	DQ115589		
Базидіома / Чехія	no.519		DQ784799	
<i>A. cepistipes</i>				
Гаплоїдна культура / Японія	94_46_01	AB510849	AB510898	AB510793
Гаплоїдна культура / Японія	900-10-12	AB510818	AB510862	AB510790
Гаплоїдна культура / Фінляндія	B2	HQ232280	HQ232288	HQ285902
Гаплоїдна культура / Фінляндія	B3	JN657418	JN657445	JN657472
Гаплоїдна культура / Італія	B5	JN657419	JN657446	JN657473
Ризоморф / Україна	C13AE	JN657420	JN657447	JN657474
Диплоїдна культура / Україна	C19AS2	JN657421	JN657448	JN657475
Ризоморф / Україна	Y16AE	JN657422	JN657449	JN657476
Диплоїдна культура / Україна	C5C-S1	JN657423	JN657450	JN657477
Ризоморф / Україна	S11A-E	JN657424	JN657451	JN657478
Чехія	BRNM706814	EU257709	EU257715	EU251395
Базидіома / Канада	S20	AY509183	AY213582	
Базидіома / США	W113	AY509184	AY213583	
<i>A. gallica</i>				
Гаплоїдна культура / Японія	NA13	AB510842	AB510890	AB510760
Гаплоїдна культура / Японія	NA4	AB510834	AB510881	AB510761
Гаплоїдна культура / Франція	E5	HQ232283	HQ232291	HQ285905
Гаплоїдна культура / Франція	E4	JN657425	JN657452	JN657479
Гаплоїдна культура / Франція	E6	JN657426	JN657453	JN657480
Гаплоїдна культура / Україна	HY1	JN657427	JN657454	JN657481
Гаплоїдна культура / Україна	HY2a	JN657428	JN657455	JN657482
Гаплоїдна культура / Україна	C1A_S	JN657429	JN657456	JN657483

Походження ДНК / Країна	Ізолят	Послідовності		
		IGS-1	ITS1-5.8S-ITS2	EF 1-alpha
1	2	3	4	5
Диплоїдна культура / Україна	Y11DS1	JN657430	JN657457	JN657484
Диплоїдна культура / Україна	Y7C-S1	JN657431	JN657458	JN657485
Ризоморф / Україна	E1E	igs		
Ризоморф / Україна	N2		its	
Чехія	BRNM706835	EU636240	EU257718	EU251390
США	CMW 3717			DQ435629
США	CMW 6901			DQ435628
Базидіома / Канада	M70	AY509171	AY213568	
Базидіома / США	ST23	AY509173	AY213671	
<i>A. ostoyae</i>				
Гаплоїдна культура / Японія	NC8	AB510848	AB510897	AB510782
Гаплоїдна культура / Японія	2002_66_03	AB510847	AB510896	AB510781
Гаплоїдна культура / Франція	C5	HQ232281	HQ232289	HQ285903
Гаплоїдна культура / Фінляндія	C2	JN657432	JN657459	JN657486
Гаплоїдна культура / Фінляндія	C4	JN657433	JN657460	JN657487
Базидіома / Україна	BpAc2	igs		
Ризоморф / Україна	Y17DS	JN657434	JN657461	JN657488
Гаплоїдна культура / Україна	HpAg1	JN657435	JN657462	JN657489
Міцеальна плівка, Швейцарія	D20	JN657436	JN657463	JN657490
Канада	V91-02			FJ618667
Канада	SP84-20			FJ618668
Спорова суспензія / США	ST1	AY509154	AY213552	
Базидіома / США	P1404	AY509157	AY213554	
Чехія	BRNM706815	EU257711	EU257717	EU251400
<i>A. mellea</i>				
Японія	94_5	AB510833	AB510880	AB510802
Базидіома / Японія	A_12	AB510820	AB510863	AB510801
Гаплоїдна культура / Франція	D4	HQ232282	HQ232290	HQ285904
Гаплоїдна культура / Франція	D1	JN657437	JN657464	JN657491
Гаплоїдна культура / Франція	D5	JN657438	JN657465	JN657492
Гаплоїдна культура / Україна	HY-3	JN657439	JN657466	JN657493
Гаплоїдна культура / Франція	HIEFpAm	igs		
США	CMW4605			DQ435633
США	CMW3964			DQ435634
США	B927	AF163608	AF163595	
США	B931	AF163607	AF163596	

Походження ДНК / Країна	Ізолят	Послідовності		
		IGS-1	ITS1-5.8S-ITS2	EF 1-alpha
1	2	3	4	5
<i>A. borealis</i>				
Гаплоїдна культура / Фінляндія	A1	JN657440	JN657467	JN657494
Гаплоїдна культура / Фінляндія	A2	HQ232279	HQ232287	HQ285901
Гаплоїдна культура / Німеччина	A5	JN657441	JN657468	JN657495
Ризоморфи, Швейцарія	A618	JN657442	JN657469	JN657496
Ризоморфи, Швейцарія	A722	JN657443	JN657470	JN657497
Чехія	BRNM699842	EU257708		EU251402
Ризоморф / Норвегія	1991-612/7	GQ847516		
Міцеліальна плівка / Норвегія	1991-347/6/2	GQ847518		
Росія	PA87-82		FJ664576	FJ618642
Росія	B1 (92142/2)		AJ250052	
Німеччина	CMW3182			DQ435623
Фінляндія	CMW3172			DQ435624

*llica* з інших географічно віддалених локалітетів. Так, послідовності зразків *A. gallica* показали один фрагмент (більше 90 п. о.)  $\approx$  560 п. о. під час розщеплення, інші види – два фрагменти  $\approx$  444 п. о. і 156 п. о. Слід зазначити, що PCR–RFLP аналіз фрагмента EF–1alpha не виявив гібридних профілів.

Для філогенетичного аналізу було отримано 106 послідовностей трьох регіонів ДНК видів *Armillaria*. Ці послідовності ДНК донатовані у GenBank. Хоча всі продукти PCR показували один фрагмент в агарозному гелі, диморфізм був зареєстрований у численних локусах для всіх проаналізованих ділянок ДНК (65 % IGS–1, 61 % ITS1–5.8S–ITS2 і 39 % EF–1alpha послідовностей). Здебільшого гетерогенність виявлена в диплоїдних зразків *Armillaria*, але також у трьох зразках від гаплоїдних культур за рДНК. Деякі автори описували гетерогенність диплоїдних ізолятів різних видів *Armillaria* раніше (Pérez Sierra et al., 1999; Lochman et al., 2004; Keča et al., 2006; Hanna et al., 2007). У літературі відомо два основних пояснення: 1 – гетерозиготність зразків, при цьому деякі дослідники вважають, що поява гібридних профілів PCR–RFLP і наявність диморфних локусів є результатом міжвидового схрещування (Pérez Sierra et al., 1999; Lochman et al., 2004, Keča et al., 2006); 2 – наявність дивергентних копій тандемно повторюваного комплексу генів і міжгенних ділянок рДНК як наслідок незавершеної гомогенізації у процесі еволюції видів *Armillaria* (Hanna et al., 2007; Antonin et al., 2009). На користь останньої гіпотези свідчать наші результати, а саме – виявлений диморфізм у рДНК від гаплоїдних чистих культур, водночас

Таблиця 2. Рестрикційні профілі IGS–1, ITS1–5.8S–ITS2і EF–1alpha регіонів ДНК

Вид	Кіль- кість зразків	Тип RFLP профілю	PCR п. о.	Довжина фрагментів після розщеплення ензимами, п. о. <sup>1</sup>			
				5	6	7	8
<b>IGS–1</b>							
			Ензим	AluI	HincII	BsmI	NdeI
<i>Armillaria borealis</i>	Літературні дані <sup>2</sup> :		920	310; 200; 104 310; 200; 135	B B	B B	H B
	5	1	907	(A1;A2;A5) <sup>2</sup> 308; 104; 191	B	B	548;359
<i>A. cepistipes</i>	Літературні дані:		920	399; 200; 183 310; 200; 135	H	B	B
	3	1	907	(B5) 584;194	584;323	B	B
	13	2		584; 401; 194; 182	584;323	B	B
	12	3		584; 308; 194; 135	584;323	B	B
	69	4		401; 182;194	584;323	B	B
	71	5		(B2; B3) 308; 194; 135	584;323	B	B
151	6	401; 308; 194; 182; 135;		584;323	B	B	
<i>A. ostoyae</i>	Літературні дані:		920	310; 200; 135	B	H	H
	6	1 2	895	(C4) 308; 197;135 (C2; C5) 308; 197;135	B B	620; 287 B	547;360 547;360
<i>A. mellea</i>	Літературні дані:		875	320; 155 320; 180; 155	B	H	B
	5	1	875	(D2; D4; D5) 317;175;151	B	567;308	B
<i>A. gallica</i>	Літературні дані:		920	399; 250; 240; 183 390; 230; 190	H	B	B
	1	1	907	(E4) 377; 257;182	560;347	B	B
	67	2		(E5; E6) 401; 233;182	584;323	B	B
3	3	401; 247;182		584;323	B	B	
<i>A. tabescens</i>	Літературні дані:		850	430; 240			
	6	1	840	422; 240	368;539	583; 324	B
RFLP профіль <i>A. cepistipes</i> / <i>A. gallica</i>	20 12 5 1	1 2 3 4	907	401; 308; 233; 135; 182; 194 401; 233; 182; 194 584; 401; 233;194; 182 584; 233; 194	584;323 584;323 584;323 584;323	B B B B	B B B B
<b>ITS1–5.8S–ITS2</b>							
			Ензим	HinPI	MboI		
<i>A. borealis</i>	Літературні дані:		870	315; 172; 103	587; 261		
	3	1	870	(A1; A2; A5) 316; 172; 104	586; 262		

Вид	Кількість зразків	Тип RFLP профілю	PCR п. о.	Довжина фрагментів після розщеплення ензимами, п. о. <sup>1</sup>			
				5	6	7	8
<i>A. cepistipes</i>	Літературні дані:		870	323; 227; 132; 103 323; 227; 132; 175; 103 323; 227; 132; 103; 67–71	371; 261; 215 371; 261; 215; 233; 138 371; 261; 215		
	29	1	870	(B2; B3; B5) 316; 227; 132; 104	372; 262; 214		
<i>A. ostoyae</i>	Літературні дані:		870	316; 228; 103 316; 228; 103; 144 316; 228; 103 316; 228; 103 316; 228; 103; 144 316; 228; 103	262; 214; 235; 137 262; 214; 235; 137 351; 262; 235 351; 262; 235; 214; 137 351; 262; 235 262; 235; 214; 137; 124		
	1	1	870	(C4) 325; 228; 94	271; 226; 214; 137		
	4	2		(C5) 316; 228; 103	262; 235; 214; 137		
	1	3		(C2) 316; 228; 103	351; 262; 235		
2	4		316; 228; 115	262; 214; 185; 124;			
<i>A. mellea</i>	Літературні дані:		870	401; 211; 159; 103 401; 370; 103	276; 215; 244; 125 276; 215; 244; 125		
	4	1	880	(D1; D4; D5) 400; 211; 160; 91	277; 215; 241; 125		
1	2			400; 371; 101	277; 215; 241; 125		
<i>A. gallica</i>	Літературні дані:		870	317; 228; 103; 69–63 317; 228; 103; 63–56 317; 228; 106-103; 56	371; 261; 215 371; 261; 215; 233; 138 371; 261; 215		
	38	1	870	(E4; E5) 316; 227; 104	372; 262; 214		
1	2			(E6) 316; 227; 117	372; 262; 214		
<i>A. tabescens</i>	Літературні дані:		870	318; 125–129; 103–93	264; 219–216; 126		
	4	1	830	315; 125–129; 93	261; 216–205; 126		
RFLP профіль <i>A. cepistipes</i> / <i>A. gallica</i>	6	1	870	316; 227; 132; 104	372; 262; 214		
EF–1alpha							
			Ензим	AluI			
<i>A. borealis</i>	3	1	586	(A1; A2; A5) 156; 430			
<i>A. cepistipes</i>	80	1	586	(B2; B3; B5) 156; 430			
<i>A. ostoyae</i>	4	1	586	(C2; C4; C5) 156; 430			
<i>A. mellea</i>	3	1	586	(D2; D4; D5) 156; 430			
<i>A. tabescens</i>	4	1	586	156; 430			
<i>A. gallica</i>	12	1	586	(E4; E5; E6) 546			

<sup>1</sup> Наявність сайта рестрикції – «Н» або його відсутність «В».<sup>2</sup> У дужках вказано тестові культури відповідного RFLP профілю.<sup>3</sup> RFLP профілі для IGS–1, наведені за Т.С. Harrington et B. D. Wingfield (1995), А. Pérez Sierra et al. (1999) і М.С. Kim et al. (2000), для ITS1–5.8S–ITS2 – за J. Lochman et al. (2004).



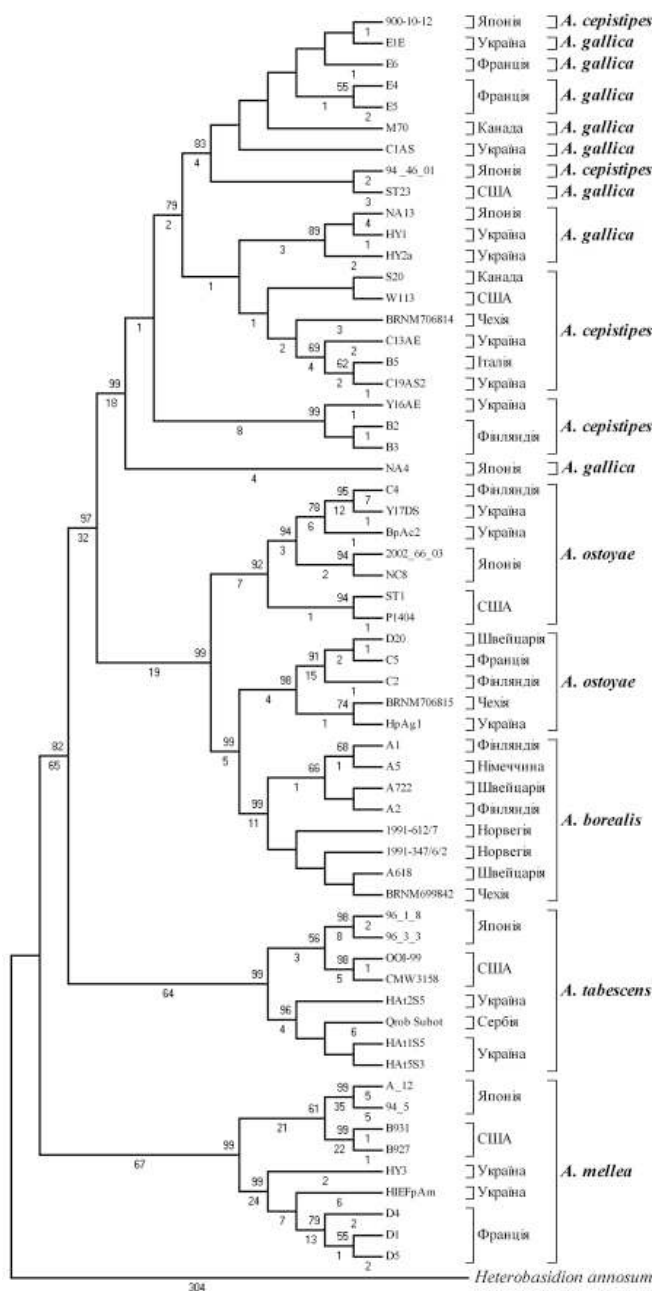


Рис. 1. IGS–1 МЕ філогенетичне дерево, де вище ліній наведена статистична підтримка бут-стреп тесту (1000 вибірок), більша за достовірну (50 %), а нижче – довжина (> 1), пропорційна філогенетичній віддаленості

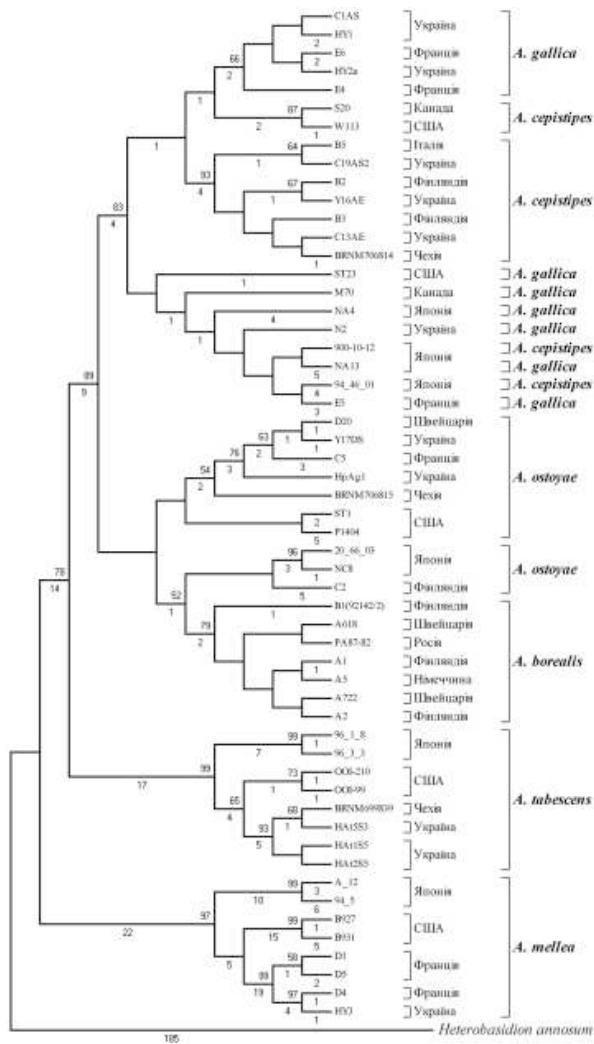
Fig. 1. IGS-1 MP phylogenetic tree: length values, proportional to phylogenetic distance, are shown below the tree branches (>1), while percentage of bootstrap support (1000 replicates) greater than 50 % are shown above the tree branches

його відсутність у послідовностях неповторюваного регіону EF–1alpha цих самих зразків. Натомість гетерогенність деяких диплоїдних зразків за неповторюваним EF–1alpha геном можна пояснити гетерозиготністю диплоїдних зразків.

**IGS–1** філогенетичне дерево показано на рис. 1, в кінцевій матриці даних для визначення його топології із 985 позицій 322 були інформативними, індекс стійкості  $C_i = 0.724$ , індекс утримання  $R_i = 0.936$ .

Рис. 2. ITS1–5.8S–ITS2 МЕ філогенетичне дерево, де вище ліній наведена статистична підтримка бут-стреп тесту (1000 вибірок), більша за достовірну (50 %), а нижче – довжина (> 1), пропорційна філогенетичній віддаленості

Fig. 2. ITS1–5.8S–ITS2 MP phylogenetic tree: length values, proportional to phylogenetic distance, are shown below the tree branches (>1), while percentage of bootstrap support (1000 replicates) greater than 50 % are shown above the tree branches



У дендрограмі чітко вирізнялися дві основні групи *A. mellea* та підклада з усіма іншими видами. Найбільш філогенетично віддалену групу до інших видів *Armillaria* в основній підкладі сформували зразки виду *A. tabescens*, які утворювали сусідню кладу до кластерів близькоспоріднених видів *A. ostoyae* – *A. borealis* і *A. cepistipes* – *A. gallica*. У межах єдиного з *A. ostoyae* кластера *A. borealis* формували видоспецифічну монофілетичну групу (бут-стреп 99 %), тоді як *A. ostoyae* – дві групи. Одна з них показала тісніший еволюційний зв'язок із зразками *A. borealis* (підтримка 98%), інша розташовувалася на паралельній сусідній гілці з підтримкою 92 %. Зразки *A. cepistipes* і *A. gallica* не утворювали видоспецифічні групи в межах спільної підклади і не проявляли філогеографічної диференціації (рис. 1).

ITS1-5.8S-ITS2 філогенетичне дерево показано на рис. 2. У ITS1-5.8S-ITS2 матриці даних із 1002 позицій 145 були парсімоно інформативними, індекс стійкості  $C_i = 0.724$ , індекс утримання  $R_i = 0.913$ .

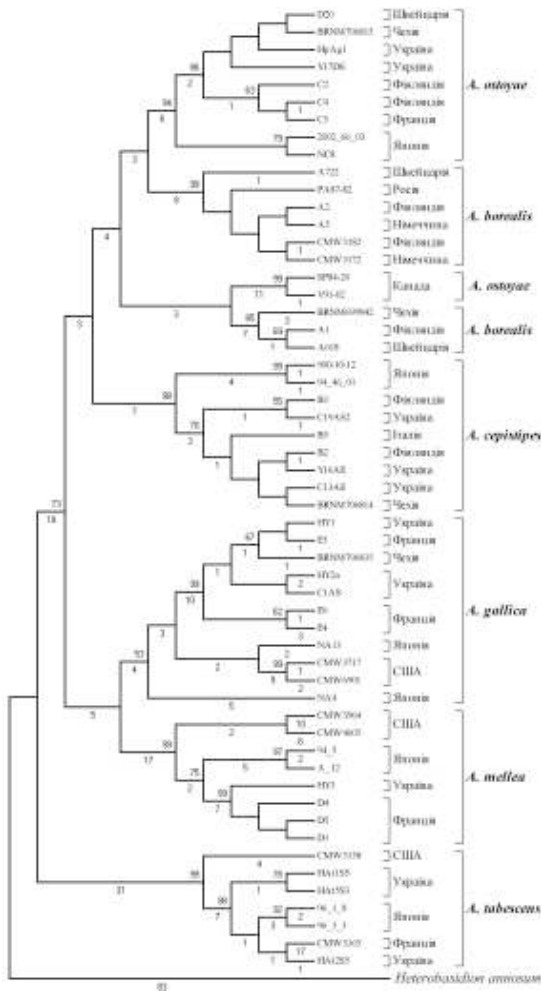


Рис. 3. EF-1alpha ME філогенетичне дерево, де вище ліній наведена статистична підтримка бут-стреп тесту (1000 вибірок), більша за достовірну (50 %), а нижче – довжина (> 1), пропорційна філогенетичній віддаленості

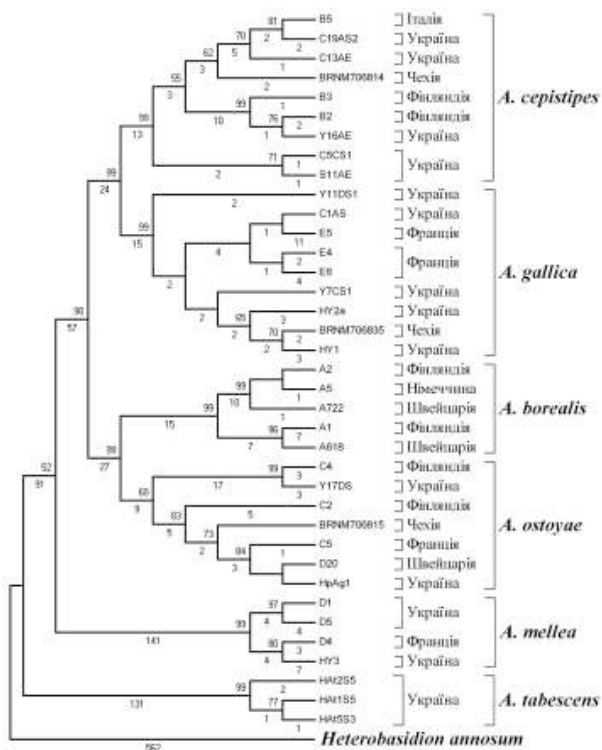
Fig. 3. EF-1alpha MP phylogenetic tree: length values, proportional to phylogenetic distance, are shown below the tree branches (>1), while percentage of bootstrap support (1000 replicates) greater than 50 % are shown above the tree branches

Загалом обидві дендрограми показують подібні результати. А саме: (1) утворення двох основних клад *A. mellea* та інших видів; (2) філогеографічну диференціацію всередині видоспецифічних підклад *A. tabescens*, *A. mellea* та (3) генетичну віддаленість *A. tabescens*; (4) формування видоспецифічної кледи *A. borealis* із високою статистичною підтримкою 79 % у межах спільного з *A. ostoyae* кластера; (5) зразки *A. ostoyae*, у свою чергу, не утворювали статистично достовірної монофілетичної кледи, але показували географічну диференціацію; (6) зразки, які належать до видів *A. cepistipes* і *A. gallica*, також не формували видоспецифічні кластери. Суттєвою відмінністю цієї кладограми від попередньої є те, що резолюція інформативних нуклеотидних сайтів у цьому регіоні ДНК дає змогу відокремити послідовності зразків *A. cepistipes* з Європейського континенту із суттєвою статистичною підтримкою (93 %), але такої тенденції для зразків *A. gallica* ми не спостерігали.

**EF-1alpha** філогенетичне дерево відображено на рис. 3. Із 598 позицій 127 були парсімоно інформативними,  $C_i = 0.624$ ,  $R_i = 0.895$ . У цій дендрограмі

Рис. 4. Комплексне МЕ філогенетичне дерево за нуклеотидними послідовностями IGS–1, ITS1–5.8S–ITS2 і фрагмента гена EF–1alpha, де вище лінії наведена статистична підтримка бут–стреп тесту (1000 вибірок), більша за достовірну (50 %), а нижче – довжина (> 1), пропорційна філогенетичній віддаленості

Fig. 4. Combined MP phylogenetic tree based on sequences of IGS–1, ITS1–5.8S–ITS2 and EF–1alpha regions: length values, proportional to phylogenetic distance, are shown below the tree branches (>1), while percentage of bootstrap support (1000 replicates) greater than 50 % are shown above the tree branches



окремо сформувалася клада безкільцевого *A. tabescens*, від усіх інших видів *Armillaria*, які морфологічно відрізняються наявністю кільця на плодовій ніжці базидіоми. У другому основному кластері помітно виділився генетично віддалений видоспецифічний кластер *A. mellea* з 99 % бут–стреп підтримкою. На відміну від філогенетичних дерев, побудованих на основі аналізу послідовностей міжгенних ділянок рДНК, у цій дендрограмі не формувалися клади близькоспоріднених видів із достовірною статистичною підтримкою. Однак уперше зразки, що належать до генетично, морфологічно й екологічно близьких видів *A. cepistipes* і *A. gallica*, утворили видоспецифічні кластери з достовірною (> 50 %) статистичною підтримкою. Послідовності *A. borealis* розділились на дві групи, одна з яких виявила філогенетичну близькість у цьому ДНК регіоні до зразків *A. ostoyae* з Північної Америки, а інша – до зразків *A. ostoyae* з Європейського континенту. Слід зазначити, що отримана нами EF–1alpha дендрограма дещо відрізняється від дендрограми, опублікованої Л. Мафозою зі співавторами (Marphosa et al., 2006), де послідовності *A. tabescens* формували єдину кладу із *A. borealis*, а не з *A. ostoyae*. Таку відмінність можна пояснити тим, що в цьому дослідженні філогенетичні зв'язки встановлювалися між ширшим рядом видів *Armillaria*, отриманих з обох півкуль, і кількість послідовностей європейських видів була досить обмеженою, тому роздільна здатність такої вибірки дає менш чітку картину філогенетичних взаємозв'язків досліджуваних нами видів. Дендрограми, побудовані на основі послідовностей від зразків *Armillaria* лише з Північної

півкулі або Європи у працях І. Хасеґави зі співавторами і В. Антоніна зі співавторами (Hasegawa et al., 2010; Antonin et al., 2009), узгоджуються з отриманими нами результатами.

**Філогеографічне порівняння.** Успішне окреслення зразків *Armillaria* за допомогою молекулярних даних стосовно географічного походження застосовували в багатьох попередніх дослідженнях. Так, Т. С. Harrington і В. D. Wingfield (1995) виявили, що північноамериканські види *A. mellea* і *A. gallica* мають відмінні *AluI* профіля RFLP від відповідних видів з європейського континенту. Філогенетичні дослідження видів роду *Armillaria* двох півкуль (Західна та Східна) показали, що види кожної півкулі формують окремі кластери (Coetzee et al., 2005). Для філогеографічного порівняння ми використали послідовності зразків видів роду *Armillaria*, ідентифікованих в Україні, і послідовності відповідних видів із Північної Америки, Європи та Японії. Для окремих видів результати дещо відрізнялися. Так, у трьох кладограмах зразки *A. mellea* групувалися відповідно до їхнього географічного походження, *A. tabescens* показували такий самий філогеографічний сигнал у ділянках рДНК, але не в EF-1alpha дендрограмі. Зразки *A. ostoyae*, попри нечітку диференціацію за видовою приналежністю в усіх трьох дендрограмах ДНК-регіонів, формували окремі підклади відповідно до географічного походження. Зразки *A. cepistipes* у IGS-1 кладограмі не проявляли філогеографічного сигналу, тоді як у кладограмі ITS зразки з Європи сформували єдину статистично достовірну кладу; також в EF-1alpha ми спостерігали досить чітку диференціацію зразків за географічним походженням. Зразки *A. gallica* з Європи лише у EF-1alpha сформували статистично достовірну єдину кладу, але навіть у цьому ДНК-регіоні зразки з Японії та Північної Америки географічних клад не утворювали. У переважній більшості зразки, зібрані в Україні, кладувалися з іншими зразками з Європейського континенту.

Оскільки зразки ідентичних видів із географічно віддалених локалітетів молекулярно різняться від зразків з Європейського континенту, подальші дослідження ми проводили лише для нуклеотидних послідовностей грибів, отриманих з Європи.

**IGS-1, ITS1-5.8S-ITS2, EF-1alpha** філогенетичне дерево за аналізом послідовностей одночасно трьох ДНК-регіонів геному *Armillaria* відтворено на рис. 4. Українські зразки тут представлені шістьнадцятьма послідовностями. Із 2216 позицій 440 були парсімоно інформативними,  $Ci = 0.773$ ,  $Ri = 0.919$ .

Суттєвою відмінністю останньої дендрограми є формування чітких видоспецифічних клад, що відповідають біологічній диференціації видів цього роду. Тобто, подібно до EF-1alpha дендрограми, послідовності *A. tabescens* сформували видоспецифічну сусідню кладу до інших видів *Armillaria*. У кластері видів *Armillaria*, які мають залишки часткового покривала на ніжці базидіоми, зразки *A. mellea* і виявили себе як найбільш генетично віддалений вид від двох груп близькоспоріднених європейських видів. Ці види, у свою чергу, розділились на два паралельні кластери – *Armillaria gallica* – *A. cepistipes*, *A. ostoyae* – *A. borealis* майже з однаковою філогенетичною дистанцією і статистичною підтримкою

99 %. У межах кластерів близькоспоріднених видів зразки, які належать до різних біологічних видів, сформували видоспецифічні клади з високими статистичними підтримками бут-стреп тесту (60–99 %).

## Висновки

Отже, за результатами молекулярно-філогенетичного аналізу встановлено, що на території України рід *Armillaria* представлений щонайменше шістьма видами, а саме: *Armillaria mellea*, *A. tabescens*, *A. gallica*, *A. cepistipes*, *A. ostoyae*, *A. borealis*. Усі вони широко розповсюджені в лісах Європейського континенту.

Філогенетичний аналіз виявлених видів роду *Armillaria* показав, що українські штами генетично ближчі до штамів з інших регіонів Європейського континенту, ніж до таких з Північної Америки та Японії. Встановлено, що найточніше відображаються філогенетичні зв'язки за сучасним уявленням про диференціацію видів у роді *Armillaria* в разі комплексного використання нуклеотидних послідовностей щонайменше трьох регіонів ДНК, наприклад – IGS–1, ITS1–5.8S–ITS2 та EF–1alpha, при цьому обмежуючи географічне походження зразків до одного континенту.

Молекулярні характеристики українських зразків узгоджуються з попередньо опублікованими даними для відповідних видів. Так, підтверджено, що зразки *A. tabescens* з України мають також коротший PCR-продукт (840 п. о.) у IGS–1 регіоні порівняно з іншими видами (875–907 п. о.) і видоспецифічний профіль із *AluI* ензимом (422 п. о. і 235 п. о.). Разом з тим виявлено низку відмінностей, які є суттєвими для ідентифікації видів роду *Armillaria*, а саме: відсутність сайту рестрикції для ендонуклеази *BsmI* у IGS–1 регіоні рДНК у деяких зразках *A. ostoyae*, що унеможливило їхнє відокремлення від зразків *A. borealis*, як описано в літературі. Проте обидва види мають сайт рестрикції з *NdeI* рестриктазою у IGS–1 регіоні (профіль  $\approx$  550 п. о. і 360 п. о.), на відміну від інших видів. Окрім того, *A. borealis* відрізняється від *A. ostoyae* зразків за PCR–RFLP профілем після розщеплення регіону ITS1–5.8S–ITS2 рестриктазою *MboI* (*A. borealis* проявляє два фрагменти:  $\approx$  586 п. о. і 262 п. о., а *A. ostoyae* – три і більше). Зразки *A. mellea* з України виявляють у IGS–1 регіоні раніше описаний у літературі профіль ( $\approx$  567 п. о. і 308 п. о.) з *Mva I269I* (*BsmI*) рестриктазою, який відокремлює цей вид від *A. gallica* і *A. cepistipes*. Уперше з'ясовано, що для близькоспоріднених видів *A. gallica* і *A. cepistipes* характерні чітко відмінні PCR–RFLP профілі з *AluI* рестриктазою у консервативній неповторюваній ділянці геному фрагмента гена EF–1alpha (*A. gallica* –  $\approx$  560 п. о., *A. cepistipes* –  $\approx$  444 п. о. і 156 п. о.). Таким чином, усі виявлені в Україні види *Armillaria* можна послідовно ідентифікувати за PCR–RFLP-аналізом трьох регіонів ДНК – IGS–1, ITS1–5.8S–ITS2 та EF–1alpha.

*Автори глибоко вдячні Swiss National Science Foundation за фінансову підтримку дослідження, колективу Swiss Federal Research Institute WSL і снігробітникам біологічного факультету УжНУ.*

## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Андріанова Т.В., Гайова В.П., Гелюта В.П. та ін. Гриби України // <http://www.cybertruffle.org.uk/ukrafung/ukr>
2. Antonin V., Tomšovský M., Sedlák P., Májek T., Jankovský L. Morphological and molecular characterization of the *Armillaria cepistipes* – *A. gallica* complex in the Czech Republic and Slovakia // Mycol. Progr. – 2009. – 8. – P. 259–271.
3. Benson D. A., Karsch-Mizrachi I., Ostell J., Sayers E. W. GenBank // NCBI (National Center for Biotechnol. Inf.), USA. – <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>
4. Coetzee M.P.A., Wingfield B.D., Bloomer P., Wingfield M.J. Phylogenetic analyses of DNA sequences reveal species partitions amongst isolates of *Armillaria* from Africa // Plant Pathol. – 2005. – 54. – P. 36–45.
5. Duchesne L.C., Anderson J.B. Location and direction of transcription of the 5S rRNA gene in *Armillaria* // Mycol. Res. – 1990. – 94. – P. 266–269.
6. Gardes M., Bruns T.D. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes amplification to the identification of mycorrhizae and rusts // Mol. Ecol. – 1993. – 2. – P. 113–118.
7. Hanna J.W., Klopfenstein N.B., Kim M.S. et al. Phylogenetic patterns of *Armillaria ostoyae* in the western United States // Forest Pathology. – 2007. – 37. – P. 192–216.
8. Harrington T. C., Wingfield B. D. A PCR-based identification method for species of *Armillaria* // Mycologia. – 1995. – 87. – P. 280–288.
9. Hasegawa E., Ota Y., Hattori T., Kikuchi T. Sequence-based identification of Japanese *Armillaria* species using the elongation factor-1 alpha gene // Mycologia. – 2010. – 102(4). – P. 898–910.
10. Keča N., Bodles W.J.A., Woodward S. et al. Molecular-based identification and phylogeny of *Armillaria* species from Serbia and Montenegro // Forest Pathology. – 2006. – 36. – P. 41–57.
11. Kim M.S., Klopfenstein N.B., McDonald G.I. et al. Characterization of North American *Armillaria* species by nuclear DNA content and RFLP analysis // Mycologia. – 2000. – 92. – P. 874–883.
12. Lochman J., Sery O., Mikes V. The rapid identification of European *Armillaria* species from soil samples by nested PCR // FEMS Microbiol. Lett. – 2004. – 237. – P. 105–110.
13. Maphosa L., Wingfield B.D., Coetzee M. P.A. et al. Phylogenetic relationships among *Armillaria* species inferred from partial elongation factor 1–alpha DNA sequence data // Australas Plant Pathol. – 2006. – 35. – P. 513–520.
14. Marxmüller H. Some notes on the taxonomy and nomenclature of five European *Armillaria* species // Mycotaxon. – 1992. – 44(2). – P. 267–274.
15. Pérez Sierra A., Whitehead D.S., Whitehead M.P. Investigation of a PCR-based method for the routine identification of British *Armillaria* species // Mycol. Res. – 1999. – 103 – P. 1631–1636.
16. Roll-Hansen F. The *Armillaria* species in Europe // Europio J. Forest Pathol. – 1985. – 15. – P. 22–31.
17. Shaw C.G.III., Kile G.A. *Armillaria* Root Disease. Agricultural Handbook. – № 691. USDA. – Washington: Forest Service, DC, 1991. – 233 p.
18. Veldman G.M., Klootwijk J., Regt V.C.H.F. d., Rudi R.J. The primary and secondary structure of yeast 26S rRNA // Nucleic Acids Res. – 1981. – 9. – P. 6935–6952
19. White T.J., Bruns T.D., Lee S.B., Taylor J.W. Analysis of phylogenetic relationships by amplification and direct sequencing of ribosomal genes // PCR Protocols / M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky, T.J. White. – New York: Acad. Press, 1990. – P. 315–322.

Рекомендує до друку  
І.В. Косаківська

Надійшла 07.02.2012 р.

Т.В. Цыкун<sup>1</sup>, С. Просперо<sup>2</sup>

<sup>1</sup> ГБУЗ «Ужгородский национальный университет», Украина

<sup>2</sup> Швейцарский федеральный научно-исследовательский институт ВСЛ

МОЛЕКУЛЯРНО-ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ВИДОВ РОДА *ARMILLARIA* (FR.) STAUDE (*PHYSALACRIACEAE*), ОБНАРУЖЕННЫХ В УКРАИНЕ

Подробно описаны молекулярные характеристики украинских образцов видов рода *Armillaria* по результатам анализа PCR–RFLP и нуклеотидных последовательностей трех ДНК-регионов: IGS–1, ITS1–5.8S–ITS2 рДНК и фрагмента гена EF–1alpha. Проведен также филогенетический анализ идентифицированных видов с украинскими образцов. Зафиксировано гетерогенность в последовательностях рДНК и обнаружено несколько новых профилей PCR–RFLP в каждом исследуемом регионе. На территории Украины идентифицированы шесть видов рода *Armillaria*: *A. borealis*, *A. cepistipes*, *A. ostoyae*, *A. mellea*, *A. gallica* и *A. tabescens*.

*Ключевые слова:* виды рода *Armillaria*, PCR–RFLP, нуклеотидные последовательности, филогенетический анализ.

T.V. Tsykun<sup>1</sup>, S. Prospero<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Uzhgorod National University, Ukraine

<sup>2</sup> Swiss Federal Institute for Forest, Snow and Landscape Research WSL, Zürcherstrasse 111, Birmensdorf, Switzerland

MOLECULAR-PHYLOGENETIC ANALYSIS OF *ARMILLARIA* (FR.) STAUDE (*PHYSALACRIACEAE*) SPP. FROM UKRAINE

Molecular-based characterization of *Armillaria* species from Ukrainian specimens was accomplished. PCR–RFLP profiles and sequences of three DNA regions: IGS-1, ITS1-5.8S-ITS2 and fragment of EF-1alpha gene were investigated. We have detected heterogeneity in rDNA region and discovered a few new PCR–RFLP profiles in each of investigated DNA region. Phylogenetic analysis of identified *Armillaria* species from Ukraine based on sequences results was performed. According to this study, six *Armillaria* species are present in the forest stands of Ukraine: *A. borealis*, *A. cepistipes*, *A. ostoyae*, *A. mellea*, *A. gallica* and *A. tabescens*.

*Key words:* species of *Armillaria fungi*, PCR–RFLP, sequences, phylogenetic analysis.