

АННОТАЦИЯ

Магистерская диссертация по теме «Молекулярная идентификация и филогения дереворазрушающих грибов рода *Armillaria*, распространенных на территории РФ» содержит 50 страниц текстового документа, 96 использованных источников, 12 рисунков, 6 таблиц (включая Приложение).

Цель работы – видовая идентификация 28 сибирских и дальневосточных образцов грибов рода *Armillaria* по 3 генетическим маркерам.

Объекты исследования – образцы грибов рода *Armillaria*.

Предмет исследования – филогенетические связи образцов.

Актуальность настоящей работы заключается в том, что среди видов *Armillaria* наблюдаются существенные различия в степени патогенности и точное определение видов *Armillaria* является критическим для оценки риска заболевания деревьев. Последние исследования показали необходимость использования нескольких локусов ДНК для точного определения видов грибов. Важно отметить, что на территории Сибири и Дальнего Востока видовая идентификация *Armillaria* с использованием нескольких генетических маркеров ранее не проводилась.

В итоге были идентифицированы все 28 образцов, собранные на территории Сибири и Дальнего Востока. Филогенетический анализ именно на основе соединенных трёх маркеров позволил с высокой точностью определить видовую принадлежность штаммов. Исследуемые образцы относятся к 4 разным видам, 18 из 28 образцов относятся к виду *A. borealis*. Уровень патогенности всех образцов согласуется с литературными данными.

Ключевые слова: ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ, ФИЛОГЕНИЯ, ИДЕНТИФИКАЦИЯ ВИДОВ, МАРКЕРНЫЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

Оглавление

Введение.....	4
Основная часть	6
1 Обзор литературы	6
1. 1 Актуальность использования генетических маркеров грибов.....	6
1.2 Идентификация видов	8
1.3 Филогения.....	10
1. 4 Видовое разнообразие и распространение.....	11
1.5 Взаимодействие симпатрических видов.....	13
1.6 Генетический маркер ITS.....	13
1.7 Генетический маркер IGS	14
1.8 Генетический маркер TEF1 α	14
1. 9 Филогенетический анализ.....	15
2 Материалы и методы	21
2.1 Сбор образцов	21
2.1 Определение уровня патогенности	21
2.3 Получение нуклеотидных последовательностей маркеров.....	22
2. 4 Филогенетический анализ.....	25
3 Результаты	26
3.1 Филогенетические деревья	26
3.2 Географическое распространение изолятов.....	Ошибка! Закладка не определена.
3.2 Патогенность	Ошибка! Закладка не определена.
4 Обсуждения	28
Заключение	31
Список использованных источников	32
Приложение.....	47

Введение

Грибы рода *Armillaria* (Опёнок) – одни из наиболее важных компонентов лесных экосистем. Они выполняют важные экологические функции разложения мертвой древесины, при этом часто становятся серьёзным патогенами, вызывая белую корневую гниль у древесных растений. Среди видов *Armillaria* наблюдаются существенные различия в степени патогенности. Например, *A. ostoyae* и *A. mellea* считаются сильно патогенными, тогда как такие виды, как *A. sinapina*, *A. gallica*, и *A. cepistipes* – менее патогенными. Таким образом, точное определение видов *Armillaria* является критическим для оценки риска заболевания деревьев.

Целесообразность использования генетических маркеров обуславливается тем, что идентифицировать виды грибов используя морфологические признаки в большинстве случаев невозможно, потому что характеристики плодовых тел зачастую перекрываются между родственными видами. Генетические маркеры позволяют с высокой точностью различать виды грибов и осуществлять генетический мониторинг уровня патогенности в популяциях.

Последние исследования показали важность изучения филогении *Armillaria* с применением нескольких локусов ДНК. Таким образом, целью данного исследования является филогенетический анализ 28 сибирских и дальневосточных образцов *Armillaria* по маркерным последовательностям ITS, IGS, TEF1 α для видовой идентификации.

Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи:

- Формирование базы нуклеотидных последовательностей маркёров ITS, TEF1 α , IGS известных видов *Armillaria*

- Построение филогенетических деревьев на основе всех трех маркеров и по отдельным маркерам
- Сопоставление данных филогении со степенью вирулентности и географическим распространением

Новизна данного исследования заключается в том, идентификация видов *Armillaria* на территории Сибири и Дальнего Востока с использованием нескольких генетических маркеров проводилась впервые.

Выпускная квалификационная работа выполнена в лаборатории лесной геномики СФУ в рамках проекта «Геномные исследования основных бореальных лесообразующих хвойных видов и их наиболее опасных патогенов в Российской Федерации», финансируемого Правительством РФ (договор №14.У26.31.0004), и частично базовыми проектами ФИЦ КНЦ СО РАН № 0356-2019-0024 и № 0287-2019-0002.

Автор работы выражает искреннюю благодарность к.б.н. Крутовскому К. В. за научное руководство, д.б.н. И. Н. Павлову за предоставленные образцы, к.б.н. Орешковой Н. В. за секвенирование ДНК, а также всем сотрудникам кафедры геномики и биоинформатики за участие в обсуждении результатов работы и ценные советы.

Основная часть

1 Обзор литературы

1.1 Актуальность использования генетических маркеров грибов

Филогенетические методы, использующие данные последовательностей ДНК, широко используются для идентификации видов *Armillaria* [1, 2, 3, 4], а так же для выяснения филогенетических связей видов с разных частей света [5, 6]. Известно, что внутренняя транскрибируемая спейсерная область (ITS) и межгенная спейсерная область (IGS-1) были полезны в изучении взаимосвязи видов из Африки [7], Южной Америки [8], Австралии [9], Северной Америки [10] Европы [11] и Азии [12]. Кроме того, последовательности для части гена фактора элонгации транскрипции альфа ($TEF1\alpha$) были использованы для определения филогенетических связей японских и европейских изолятов [13].

Род *Armillaria* (включая тесно связанный с ним род *Desarmillaria*), в настоящее время включает более 40 официально описанных видов по всему миру и играет центральную роль в динамике древесных экосистем [14]. Большое видовое разнообразие и широкое географическое распространения этого рода, вероятно, была обеспечена сочетаниями нескольких факторов:

1. Высокая пластичность к условиям окружающей среды. Виды *Armillaria* распространены в различных геологических условиях: они встречаются на разных высотах (как и на уровне моря, так и на больших возвышениях) и на разных типах почв [15].
2. Виды *Armillaria* могут осваивать новые пищевые ресурсы, используя различные экологические стратегии. Они распространяются на мертвой

древесине (например, на корнях, пнях и обломках) многих древесных пород природных и искусственных экосистем [16]. Таким образом, один и тот же организм (то есть мицелий, обладающий одним и тем же генотипом) может сохраняться на одном и том же участке в течение смены нескольких поколений деревьев и достигать возраста более тысячи лет [17, 18]. Некоторые виды *Armillaria* являются факультативными паразитами, способными поражать не только ослабленные, но и здоровые древесные растения [19]. Паразитирование дерева приводит к появлению белой корневой гнили и, в конце концов, его гибели.

3. Виды *Armillaria* используют эффективную стратегию распространения. Локальное распространение происходит как через ризоморфы, так и через корневые контакты. Ризоморфы являются подземными структурами диаметром 1-5 мм, через которые виды *Armillaria* занимают окружающую почву и осваивают новые пищевые ресурсы. Образование ризоморфов считается стратегией, которая позволила видам *Armillaria* получить конкурентное преимущество. Помимо ризоморфов, прямой контакт между корнями позволяет мицелию, присутствующему в зараженных корнях, инфицировать здоровые корни соседних деревьев [20, 21] (рисунок 1). Предполагается, что распространение на большие расстояния происходит через базидиоспоры [22].

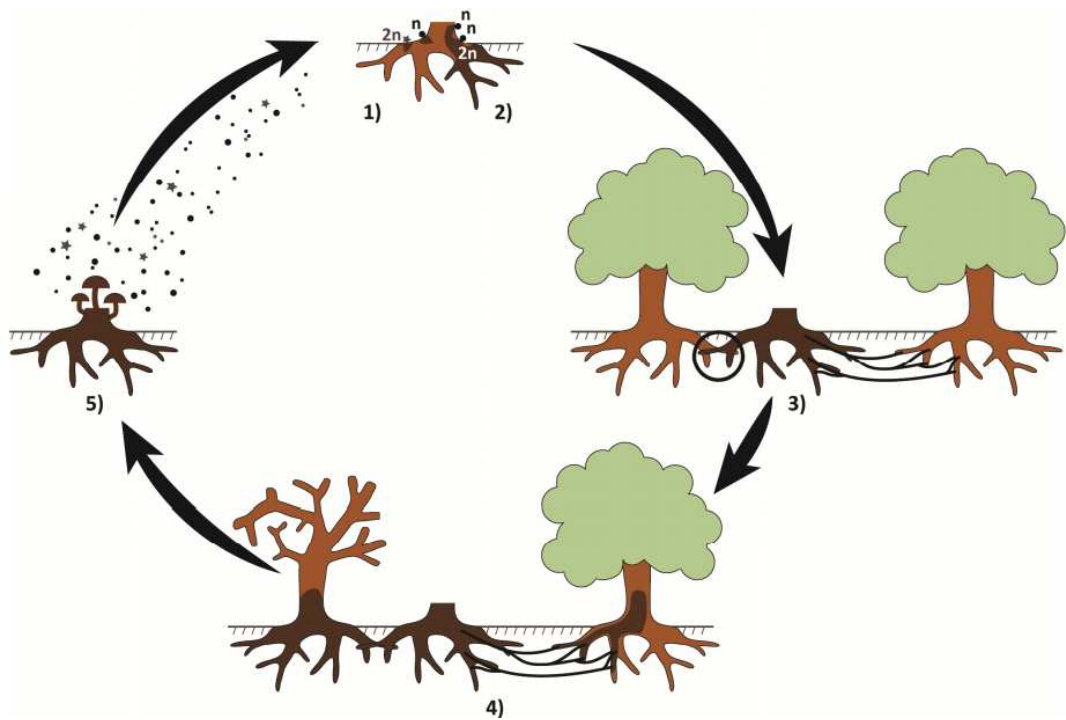


Рисунок 1 – схематическое изображение жизненного цикла *Armillaria*

1) Базидиоспоры прорастают на дереве, образуя гаплоидный (n) мицелий (гетероталлический вид) или диплоидный ($2n$) мицелий (гомоталлический вид); 2) У гетероталлических видов после спаривания образуется диплоидный мицелий. Как у гетероталлических, так и у гомоталлических видов диплоидный мицелий колонизирует древесный субстрат; 3) здоровые деревья заражаются через корневые контакты с пораженными деревьями, либо через ризоморфы, вырастающими из пораженного дерева; 4) *Armillaria* проникает в корневую систему и нижний ствол зараженных деревьев, вызывая гниение камбия; 5) Плодоносящие тела развиваются на мертвом или умирающем дереве и высвобождают базидиоспоры в окружающую среду [23].

1.2 Идентификация видов

Определение видов грибов является сложной задачей, и за многие годы разрабатывались различные концепции видов [24, 25]. В систематике

Armillaria используются три концепции разделения видов: морфологическая, биологическая и филогенетическая. Все они имеют свои ограничения и могут давать противоречивые результаты. Недостатки определение видов на основе морфологии плодовых тел (базидиокарпов) в том, что плодовые тела образуются нерегулярно и недолговечны. Более того, у некоторых видов плодовые тела трудно индуцировать *in vitro*, и их характеристики могут не соответствовать характеристикам плодоносящих тел, собранных на природе [26]. Кроме того, макро- и микрохарактеристики плодовых тел широко перекрываются между родственными видами, такими как *A. cepistipes*, *A. gallica* и *A. nabsnona* [27] или *A. ostoyae* и *A. gemina* [28].

Большинство видов *Armillaria* имеют гетероталлическую систему спаривания (только гаметы двух разных гаплоидных мицелиев противоположного пола могут сливаться и образовывать зигоспору), и между видами существуют репродуктивные барьеры [29]. Таким образом, биологическое (сексуальное) распознавание видов *Armillaria* интенсивно используется с 1970-х годов [30, 31]. Следовательно, большинство известных в настоящее время видов *Armillaria* определялись на основе сексуальной совместимости. Однако биологическое определение видов имеет ряд серьезных ограничений. Аллопатрические виды могут демонстрировать неполные репродуктивные барьеры, например, *A. cepistipes* и *A. sinapina* [32, 33].

В последние годы благодаря быстрому прогрессу в методах, основанных на анализе ДНК, и доступности большого количества секвенированных последовательностей, определение видов грибов с помощью филогенетического анализа приобрело большую популярность [34]. Тем не менее, оно имеет некоторые ограничения в изучении систематики *Armillaria*. Одним из основных недостатков является то, что филогения на основе одного гена не обязательно отражает эволюционную историю вида и взаимоотношения, например, из-за гомоплазии или

горизонтального переноса. В результате топология филогенетических деревьев может быть неконгруэнтной [35]. Эту проблему можно в значительной степени избежать, используя многолокусный подход [36]. Внутривидовая изменчивость генов также иногда может нарушать топологию филогенетического дерева. Например, *A. borealis*, по-видимому, обладает двумя различными версиями гена фактора элонгации трансляции 1- α (TEF1 α), которые образуют два неродственных кластера [36].

1.3 Филогения

С 1990-х годов филогения рода *Armillaria* в основном исследуется на основе молекулярно-генетических данных. Первоначально исследования проводились с помощью нуклеотидных последовательностей межгенного спейсера 1 (IGS-1), который располагается между генами 28S и 5S рРНК, а также внутреннего транскрибируемого спейсера (ITS), находящимся между генами 18S и 5.8S рРНК [37, 38]. Впоследствии Maphosa et al. [5] продемонстрировали целесообразность использования гена TEF1 α для построения филогении *Armillaria*. По сравнению с последовательностями генов рРНК, TEF1 α , по-видимому, дает лучшее разделение видов таких как *A. gallica* и *A. cepistipes* и других близкородственных видов [39, 40]. В последнее время мультилокусные филогении начали вытеснять моногенные [39, 36], так как они более точно описывают эволюционную историю рода.

Филогенетические исследования, проведенные в последние годы, относят род *Armillaria* к порядку *Agaricales* отдела *Basidiomycota*, в котором он образует семейство *Physalacriaceae* вместе с другими родами [41]. Филогеномный анализ, основанный на 835 консервативных генах, показал, что *Guyanagaster* и *Cylindrobasidium* являются наиболее филогенетически близкими родами по отношению к *Armillaria* [42]. В исследованиях [43] и

[42] установили, что разделение родов *Armillaria* и *Guyanagaster* произошло 40-50 миллионов лет назад.

С недавнего времени в роду *Armillaria* различают две группы: *Desarmillaria*, состоящий из видов *D. ectypa* и *D. tabescens* (ранее *A. ectypa* и *A. tabescens*) и рода *Armillaria*, который содержит все остальные виды [43].

1. 4 Видовое разнообразие и распространение

База данных Mycobank (<http://www.mycobank.org/>) в настоящее время насчитывают более 70 видов *Armillaria*, но только около 40 из них хорошо описаны. Не смотря на то, что на сегодняшний день имеется картина глобального распространения видов *Armillaria* (рисунок 3), большинство публикаций в основном посвящены изучению видов из Европы и Северной Америки. Более того, зачастую отсутствуют подробные знания об экологии многих из зарегистрированных видов.



Рисунок 2 – Географическое распространение видов грибов *Armillaria* и *Desarmillaria* [23]

Знаком * отмечены виды, о которых сообщается только в конкретном географическом районе, знак § указывает на виды, предположительно интродуцированные в конкретный географический район, # отмечены новые виды, ожидающие более детального описания.

Одной из важных биологических особенностей видов *Armillaria* является их способность к распространению в почве с помощью ризоморфов [44]. Эта форма вегетативного размножения в сочетании с переносом мицелия через корневые контакты может приводить к образованию очень крупных клональных особей [45, 18]. Однако зачастую размер видов *Armillaria* составляет менее одного гектара [46, 47]. Размеры видов отчасти связаны с их разными экологическими ролями. Некоторые виды (например,

A. gallica и *A. cepistipes*) интенсивно образуют ризоморфы, благодаря которым они быстро расширяются в почве и захватывают новые пищевые ресурсы [15]. Другие виды (например, *A. mellea*, *A. ostoyae*) образуют меньше ризоморфов, и их распространение в почве происходит главным образом посредством корневых контактов [48].

1.5 Взаимодействие симпатрических видов

Полевые исследования, проведенные в Северной Америке и Европе, показали, что несколько видов *Armillaria* могут встречаться в одном и том же лесном насаждении. Сосуществование видов, преимущественно сапротрофных с паразитическими, по-видимому, частое явление. Например, *A. cepistipes* или *A. sinapina* часто сосуществуют с *A. ostoyae*, а *A. mellea* с *A. gallica*. Это явление может отражать эволюцию разных экологических ролей видов из-за конкуренции за одни и те же ресурсы [49, 50, 51].

1.6 Генетический маркер ITS

ITS (Internal transcribed spacer) – внутренний транскрибируемый спейсер расположенный между генами малой и большой субъединицами рибосомальной РНК (рисунок 3). Последовательность ITS высоко вариабельна и позволяет легко отличать близкородственные организмы. Маркер продемонстрировал довольно высокую способность правильной идентификации видов для большого числа грибов [52]. ITS был принят в качестве стандартного маркера для грибов. Однако тщательное изучение последовательностей ITS в международных базах данных нуклеотидных последовательностей (GenBank, EMBL и DDBJ) показало, что эта область не одинаково изменчива во всех группах грибов [53]. Примечательно, что для некоторых родов *Ascomycota*, включая *Penicillium*, *Aspergillus* [54] и *Fusarium* [55], идентификация с использованием ITS оказалась весьма затруднительной.

1.7 Генетический маркер IGS

IGS (Intergenic spacer) – межгенный спейсер, располагается между множеством тандемно повторяющихся копий генов рРНК [56]. Гены рРНК грибов тандемно повторяются, причем каждый повтор кодирует гены 18S (малая субъединица), 5.8S и 26S (большая субъединица). В каждом повторе существуют две области: область внутреннего транскрибируемого спейсера (ITS) и область межгенного спейсера (IGS). Ген 5S рДНК делит IGS на две меньшие области - IGS1 и IGS2 (рисунок 3). Для некоторых видов грибов регион IGS является одним из наиболее подходящих маркеров для выяснения межвидового и внутривидового разнообразия [57].



Рисунок 3 - Схема области генов рРНК с участком локализации ITS и IGS [58].

1.8 Генетический маркер TEF1 α

TEF1 α (translation elongation factor 1 α) – является частью комплекса эукариотического фактора элонгации 1, основной функцией которого является облегчение удлинения аминокислотной цепи полипептида во время процесса трансляции [59]. На сегодняшний день, TEF1 α чаще всего используется в качестве маркера в филогенетических и таксономических исследованиях грибов [60, 61].

1. 9 Филогенетический анализ

Молекулярная филогенетика изучает молекулярные различия, преимущественно последовательностей ДНК, для получения информации об эволюционных отношениях организмов. С помощью филогенетического анализа можно определить процессы, с помощью которых достигается биологическое разнообразие видов. Результат выражается в филогенетическом дереве [62].

1.9.1 Метод матрицы расстояний (distance matrix)

В основе этого метода лежит попарный расчет различий между генами организмов. Все гены сравниваются по каждому нуклеотиду, и чем больше различий, тем больше будет расстояние между видами. Далее строится матрица, в которую заносятся все значения для всех возможных пар сравниваемых генов и такая матрица расстояний является входной информацией для построения дерева.

Наиболее часто используемый алгоритм матрицы расстояний – это метод ближайших соседей (*neighbour joining*), в котором среди всех видов находятся два с минимальными различиями. Данные этих двух видов в матрице расстояний объединяются в дальнейшем анализе. Все виды проходят этот процесс пока не будет найден окончательный вариант дерева. Такой алгоритм достаточно прост, не требует больших вычислительных мощностей и подходит для обработки большого объема данных [63].

К недостаткам этого метода можно отнести следующее:

1. Метод всегда выдает дерево с единственным возможным вариантом ветвления.
2. Расчет расстояний проблематичен, когда последовательности дивергированы и имеют много разрывов в выравнивании.
3. Отрицательные длины ветвей не являются значимыми.

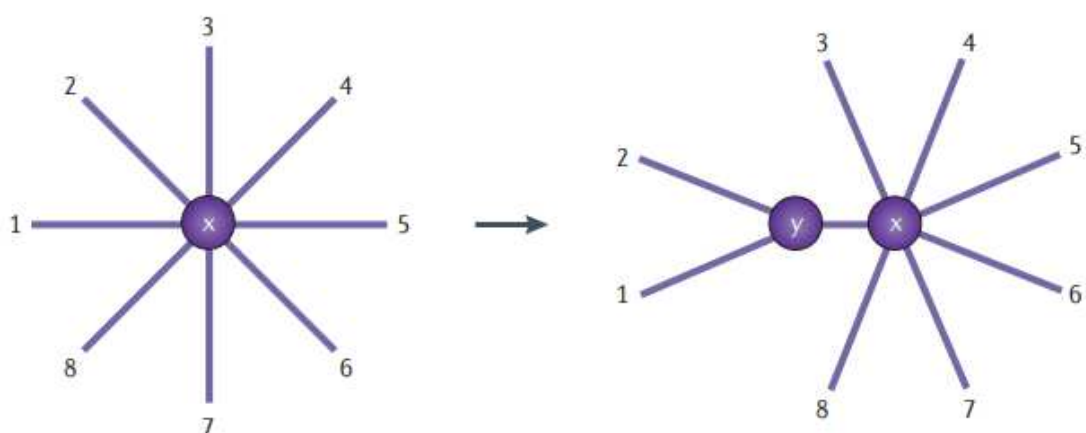


Рисунок 1 – алгоритм ближайших соседей (neighbour-joining) [64]

В настоящее время в большинстве филогенетических исследований методы матрицы расстояния используют крайне редко, однако, их часто применяют для быстрого построения филогенетических деревьев вирусов и бактерий [65].

1.9.2 Метод максимальной экономии

Не использует матрицы расстояний, вместо этого работает с наборами состояний признаков. Суть алгоритма в нахождении дерева с наименьшим суммарным числом переходов состояний всех признаков. Принцип наибольшей экономии определяет наиболее вероятное филогенетическое дерево, которое включает в себя наименьшее количество переходов состояний признаков. Первый этап анализа — это создание матрицы признаков. Каждый признак должен иметь хотя бы два состояния. Состояниями признаков могут быть нуклеотиды или аминокислоты в определенных позициях множественных выравниваний. Когда на кладограмме у группы таксонов состояние отличается от предкового, то это и будет считаться переходом состояния [66].

Минусы данного метода заключаются в следующем:

1. Не учитывается длина ветвей, которая отображает количество замен нуклеотидов.
2. Не учитываются разные модели замены нуклеотидов

1.9.3 Методы, основанные на моделях эволюции

Модели эволюции

Чаще всего используются модели семейства GTR (General Time-Reversible) (Рис 4). К нему относятся модели нуклеотидных замен: JC69, K80, F81, HKY85, TN93, GTR.

1. Jukes-Cantor (JC)

Модель Джукса-Кантора предлагает одинаковые частоты (25%) и замещения нуклеотидов. Редко используется на реальных данных.

2. Felsenstein 1981 (F81)

Расширенная модель Джукса-Кантора. Нуклеотидные частоты могут отличаться от 25%, однако вероятности замен считаются одинаковыми.

3. Kimura 2 parameter (K80)

Допускает одинаковые частоты встречаемости нуклеотидов. Для транзиций и трансверсий вероятности считает различными.

4. Hasegawa-Kishino-Yano (HKY)

Позволяет использовать дополнительные параметры, введенные в моделях F81 и K80. Нуклеотидные частоты, как и вероятности транзиции с трансверсиями различаются.

5. Tamura-Nei (TrN)

Предполагает различные частоты встречаемости нуклеотидов. Для трансверсий вероятности замен одинаковы, но могут быть различны для транзиций.

6. General time reversible (GTR)

Использует различные частоты нуклеотидов и различные частоты замен нуклеотидов.

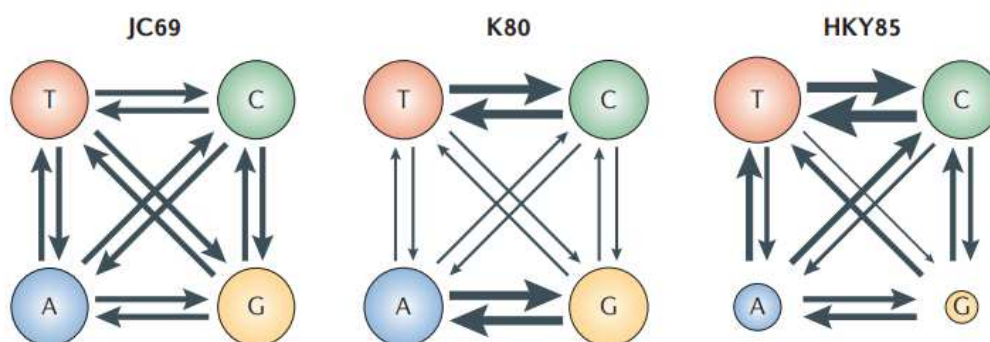


Рисунок 4 – Модели замен нуклеотидов [11]

Толщина стрелок отображает скорости замещения четырех нуклеотидов, размеры кругов представляют собой частоты нуклеотидов, когда процесс замещения находится в равновесии.

Один из широко применяемых методов в построении филогенетических деревьев, основанных на моделях эволюции – метод максимального правдоподобия (Maximum Likelihood, ML). Для построения дерева определяются модели замены нуклеотидов, на основании которой впоследствии будут рассчитываться вероятности. Также в построении деревьев используется длина ветви или эволюционная дистанция между таксонами. Во время анализа вычисляются наиболее вероятные длины ветвей с учетом выбранной модели замен. Затем вероятности ветвей дерева умножаются, и дерево, которое имеет наибольшую вероятность, считается конечным [67].

Байесовский метод. Как и метод максимального правдоподобия, для построения филогении тоже использует модели нуклеотидных замен и длины ветвей. Отличается от максимального правдоподобия тем, что параметры в модели считаются случайными величинами со статистическими распределениями, тогда как в максимальном правдоподобии они являются неизвестными постоянными константами. Также использует вдобавок апостериорную вероятность (*posterior probability*), которая может рассчитываться как на основании исходных данных, так и полученных результатов анализа. Данный подход стал широко использоваться благодаря быстрой скорости вычислений и интеграции алгоритмов Монте-Карло и марковских цепей [68].

1.9.4 Подходы «супердерева» и «суперматрицы»

При построении филогении с использованием множества генов существуют два подхода. При подходе «супердерева» отдельно анализируется каждый ген, а затем используются эвристические алгоритмы для сборки отдельных деревьев по каждому гену для всех таксонов. То есть, супердерево это одна кладограмма, представляющая из себя комбинации меньших деревьев, оценивается на основе консенсуса (Рисунок 5). Такой анализ полезен при изучении горизонтального переноса генов, однако слабо эффективен в оценке стандартных филогенетических взаимоотношений.

2 Материалы и методы

2.1 Сбор образцов

28 образцов грибов рода *Armillaria* были отобраны с усыхающих деревьев хвойных и лиственных пород с разными уровнями патогенности и условиями произрастания на территории Сибири (Красноярский край и Республика Хакасия) и Дальнего Востока (Сихотэ-Алинь). Точные координаты и данные уровня патогенности каждого образца *in situ* и *in vitro* представлены в Таблице А.1 в Приложении.

2.1 Определение уровня патогенности

Уровень патогенности *in situ* оценивалась по 3х балльной шкале:

1 – низкая, усыхание деревьев в нижнем ярусе; гибель отдельных деревьев, как правило, без образования групп; редко встречающийся тонкий мицелий *Armillaria* на корнях.

2 – средняя, единичное усыхание деревьев (или небольшие группы до 7 деревьев), господствующих в верхнем пологе, в течение нескольких лет с ярко выраженным предварительным ослаблением, постепенным опадением хвои; ярко выраженный мицелий *Armillaria* на корнях, редко поднимающийся выше корневой шейки.

3 – высокая, усыхание деревьев, господствующих в верхнем пологе, без признаков предварительного ослабления; ярко выраженная группа усыхающих деревьев (> 7 деревьев); быстрое усыхание деревьев (в течение 1 года); наличие высоко поднимающегося веера мицелия *Armillaria*.

Патогенность штаммов *in vitro* определялась путем инокуляции сеянцев *Abies sibirica* чистыми культурами патогена и оценивалась их гибель

на 90 сутки вегетации. В качестве контроля выступали незараженные образцы. Вдобавок, инокулировались черенки *Populus tremula*, а так же корни проростков *Picea abies* и оценивалась степень некроза. Степень патогенности оценивалась во всех случаях по так же по 3х балльной шкале:

1) Шкала оценки гибели на 90 сутки вегетации сеянцев *Abies sibirica*:

- 1 балл – на 10 % выше контроля;
- 2 балла – на 20-30 % выше контроля;
- 3 балла – на 40-50 % выше контроля.

1) Шкала оценки некроза черенков *Populus tremula*:

- 1 балл – точечный некроз около точки инокуляции;
- 2 балла – умеренный некроз, распространяется равномерно от точки инокуляции;
- 3 балла – масштабный, слияние некротических зон соседних точек инокуляции.

2) Шкала оценки некроза корни проростков *Picea abies*:

- 1 балл – некроз корней у 10-20 % проростков;
- 2 балла – 25-40 %;
- 3 балла – более 40 %.

2.3 Получение нуклеотидных последовательностей маркеров

ДНК выделялась из чистых культур изолятов с использованием набора DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen Inc. Germantown, MD) и амплифицировалась с помощью ПЦР (программа ПЦР приведена ниже в таблице 1) с использованием пар праймеров, указанных в таблице 2.

Таблица 1 – Программа проведения ПЦР реакции

95 °С	15 мин
94 °С	1 мин
50 °С	1 мин
72 °С	1 мин
Со 2-го шага по 4-ый повторить 35 циклов	
72 °С	20 мин
16 °С	бесконечно

Таблица 2 – Праймеры для маркерных последовательностей грибов

№ пары	Название праймера	Последовательность (5'->3')	Источник
1	ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	[70]
1	ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	
2	ITS1-F	CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA	[71]
2	ITS4-B	CAGGAGACTTGTACACGGTCCAG	
3	EF595F	CGTGACTTCATCAAGAACATG	[72]
3	EF1160R	CCGATCTTGTAGACGTCCTG	
4	Arm EF1-a-FOR	GGAACTGGTGAGTTCGAAGCC	[73]
4	Arm EF1-a-REV	AGACGGAGAGGCTTGTCG GAG	
5	IGS1 LR12R	CTGAACGCCTCTAAGTCAGAA	[74]
5	IGS1 O-1	AGTCSTATGGCCGTGGAT	

Нуклеотидные последовательности ITS, TEF-1a и IGS 28 образцов грибов были секвенированы с помощью генетического анализатора ABI Genetic Analyzer 3130xl (Applied Biosystems, Foster City, USA) в отделении лесной генетики и селекции лесных деревьев университета Гёттингена (Германия)

Благодаря филогенетическим исследованиям, проведенным за последние годы разными группами исследователей, были накоплены данные по генетическим маркерным последовательностям многих видов грибов *Armillaria* в международной базе данных GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/). Таким образом, в данном исследовании, кроме собранных образцов на территории Сибири и Дальнего Востока, использовались нуклеотидные последовательности маркеров известных видов *Armillaria*, взятые из базы данных GenBank. Это позволило провести филогенетический анализ и тем самым идентифицировать неизвестные образцы.

В анализ были включены 8 видов *Armillaria* и 1 вид близкородственного вида *Guyanagaster necrorhizus* в качестве внешней группы (таблица 3). В результате, каждый вид *Armillaria* был представлен несколькими штаммами. Номера доступа нуклеотидных последовательностей всех трех маркеров каждого штамма и их география представлены в таблице А.2 в Приложении.

Таблица 3 – Количество представленных штаммов с секвенированными TEF1a, ITS, IGS в базе данных GenBank

Вид	Количество штаммов
<i>A. borealis</i>	4
<i>A. gallica</i>	10
<i>A. cepistipes</i>	12
<i>A. mellea</i>	8
<i>A. tabescens</i>	6
<i>A. sinapina</i>	4
<i>A. ostoyae</i>	11
<i>A. nabsnona</i>	4
<i>G. necrorhizus</i>	1
Всего	60

2. 4 Филогенетический анализ

Множественное выравнивание последовательностей по каждому отдельному маркеру проводилось в программе Ugene v. 34.0 [75] с помощью алгоритм выравнивания MUSCLE, который создает высокоточные множественные выравнивания последовательностей [76]. Определение позиций кодонов последовательности белок-кодирующей гена TEF1a проводилось в программе Mega7 [77]. Далее, все три выравнивания конкатенировались, т.е. соединялись в один файл в программе Seaview v. 3.2 [78].

Так как каждый локус имеет отдельную эволюционную историю, необходимо для каждого отдельного локуса рассчитать свою модель эволюции. Лучшие модели эволюционных замен в выравнивании, состоящим из трех маркеров, находились с помощью PartitionFinder2 v. 2.1.1 [79] на основании AIC (информационный критерий Акаике) [80]. Лучшие модели для отдельных выравниваний маркеров определялись с помощью ModelFinder [81]. PartitionFinder2 разделил выравнивание на 3 части (TEF1a_1, TEF1a_3), (ITS, TEF1a_2) и IGS. Модель TRNEF+I+G была выявлена как наилучшая для набора (TEF1a_1, TEF1a_3), модель K81UF+I+G для (ITS, TEF1_2) и TRN+G для IGS. Для отдельных выравниваний маркеров были определены следующие лучшие модели: TNe+G4 для TEF1a и HKY+F+G4 для ITS и IGS.

Построение деревьев было выполнено с помощью программы IQ-TREE v 1.6.12, основанной на методе максимального правдоподобия [82]. Расчет поддержки узлов дерева осуществляли программой на основе 1000 реплик бутстрэпа.

Для поиска групп штаммов, которые представляют собой один организм, рассчитывалась матрица попарного генетического расстояния с использованием библиотеки R seqinr [83].

3 Результаты

3.1 Филогенетические деревья

Всего было проанализировано 28 изолятов грибов *Armillaria*, собранных на усыхающих деревьях хвойных и лиственных пород с разными уровнями патогенности на территории Сибири (Красноярский край и Республика Хакасия) и Дальнего Востока (Сихотэ-Алинь). Построение общего дерева по трем маркерам ITS, IGS, TEF1 α распределило 28 образцов по 5 кладам известных видов и высоким уровнем поддержки ветвей (Рисунок 7). 5 образцов сгруппировались в кладу *A. cepistipes*, 2 образца попали в кладу *A. gallica*, 3 – в *A. ostoyae*. Вид *A. borealis* образовал 2 клады: одну большую, в которую вошли 17 образцов, и маленькую, куда попал 1 образец. Распределение образцов так же представлено в таблице 3.

Таблица 3 – распределение образцов по кладам на дереве, построенном по трем маркерам

Клада	Образцы
<i>A. cepistipes</i>	14, 13, 22, 11, 2
<i>A. gallica</i>	7, 8
<i>A. ostoyae</i>	12, 10, 9
<i>A. borealis</i>	20, 18, 3, 4, 21, 6, 28, 5, 23, 27, 26, 25, 15, 19, 1, 24, 16
<i>A. borealis 2</i>	17

Изъято 7 страниц.

4 Обсуждения

Цель идентификации изолятов *Armillaria* была достигнута с использованием филогенетического анализа на основе трех маркеров. Образцы представляют виды *A. borealis*, *A. gallica*, *A. ostoyae* и *A. cepistipes*, которые ранее были идентифицированы на территории Сибири по морфологическим признакам [84].

Филогенетические деревья полученные на основе трех маркерных последовательностей хорошо дифференцировали все образцы. Деревья, построенные с использованием ITS и IGS, напротив, давали смешанные клады, такие как *A. ostoyae* / *A. borealis* и *A. gallica* / *A. cepistipes* / *A. sinapina*, т.е. эти виды представлялись одной группой. Это может объясняться тем, что *A. ostoyae* и *A. borealis* действительно являются близкородственными видами. Возможными объяснениями их эволюционного сродства может быть как сохранение предкового полиморфизма, так и гибридизация между видами [85]. *Armillaria gallica*, *A. cepistipes* и *A. sinapina* также являются филогенетически близкородственными видами и морфологически очень похожи [86]. Филогения на основе TEF1 α дала лучшую видовую дифференциацию среди филогенетических деревьев, построенных по отдельным маркерам. Предыдущие исследования так же показали, что TEF1 α обеспечивает лучшую вариабельность, чем районы ITS и IGS [86, 44, 40].

Одной из особенностей филогенетического дерева на основе TEF1 α , а так же с использованием трех маркеров, является то, что изоляты *A. borealis* образовали две клады. Подобное явление наблюдалось и в других исследованиях. Интересно, что эти две группы не имели географических связей [87, 88]. В данном исследовании обе клады так же имеют смешанную географию и содержат как европейские, так и азиатские штаммы. Это позволяет предположить, что *A. borealis* может быть представлен двумя разными филогенетическими линиями, либо то, что *A. borealis* имеет две

версии гена TEF1 α , которые проявляются в виде неродственных кластеров в филогении [89].

Armillaria borealis оказался наиболее часто встречающимся видом. Он встречался как на деревьях с мицелием на корнях, редко поднимающийся выше корневой шейки, с ярко выраженным предварительным ослаблением, так и на деревьях без признаков предварительного ослабления с наличием высоко поднимающегося веера мицелия. Таким образом, данный вид, по-видимому, является преобладающим видом *Armillaria* на территории Сибири.

Второй по частоте встречаемости вид *A. cepistipes* был изолирован только с мест усыхания деревьев в нижнем ярусе, гибель отдельных деревьев не образовывала групп. На корнях встречался редкий и тонкий мицелий. Данные о доминировании *A. borealis* и *A. cepistipes* согласуются с результатами работы, проведенной ранее на территории Сибири с помощью метода идентификации видов на основе тестов сексуальной совместимости (*mating test*) [90].

Изоляты вида *A. ostoyae*, который давно признан агрессивным первичным патогеном, встречались только в местах усыхания деревьев, господствующих в верхнем пологе, без признаков предварительного ослабления и с ярко выраженными группами усыхающих деревьев. Так же наблюдалось быстрое усыхание деревьев (в течение 1 года) и наличие высоко поднимающегося веера мицелия, что так же соответствует части изолятов *A. borealis*.

Из-за высокой степени патогенности и широкого распространения *A. ostoyae*, были проведены многочисленные исследования этого вида [91, 92]. К сожалению, подробные знания об экологии *A. borealis* пока отсутствуют. Полевые исследования показывали, что *A. borealis* зачастую является менее патогенным, чем *A. ostoyae*, и то, что *A. borealis* реже участвующих в первичных атаках на живые деревья [93, 94]. По-видимому,

A. borealis время от времени действует как вторичный патоген, заражая и, в конечном счете, убивая деревья, которые были предварительно ослабленными другими абиотическими или биотическими факторами [93].

В то время как экспериментальные данные о патогенности и *A. borealis* ограничены, полученные данные позволяют предположить, что *A. borealis* является аналогичным или менее вирулентным, чем *A. ostoyae* в отношении проростков хвойных [95], что согласуется с экспериментальными данными в отношении изучения патогенности *in vitro* сибирских изолятов *A. borealis*.

Armillaria gallica был изолирован в местах усыхания деревьев в нижнем ярусе с редко встречающимся тонким мицелием на корнях, либо в местах с единичным усыханием деревьев с предварительным ослаблением и ярко выраженным мицелием на корнях. Данный вид считается сапротрофом как и его близкородственный вид *A. cepistipes*. Ранее было показано, что виды, продуцирующие моноподиально разветвленные ризоморфы как *A. gallica* и *A. cepistipes*, являются менее агрессивными, чем виды с дихотомически разветвлением ризоморфов (*A. mellea*, *A. borealis* и *A. ostoyae*) [95].

В этом исследовании штаммы 11 и 10 (*A. ostoyae* и *A. cepistipes* соответственно) были изолированы с соседних деревьев. О сосуществовании нескольких разных видов *Armillaria* на близкорасположенных территориях ранее сообщалось, преимущественно о *A. cepistipes* и *A. ostoyae* [96]. Остальные штаммы, собранные на соседних деревьях, оказались одними и теми же организмами.

Заключение

Впервые была произведена генетическая идентификация сибирских и дальневосточных образцов рода *Armillaria*. Филогенетический анализ именно на основе соединенных трёх маркеров позволил с высокой точностью определить видовую принадлежность исследуемых образцов. Образцы относятся к 4 разным видам, 18 из 28 образцов относятся к виду *A. borealis*. Уровень патогенности всех образцов согласуется с литературными данными.

Филогенетические деревья на основе трех маркеров, а так же отдельного маркера TEF1 α образовали две клады *A. borealis*. Но на данный момент невозможно ответить на вопрос, существует ли ассоциация между ли разделением вида на две клады и степенью патогенности. Для изучения этого вопроса необходимы целенаправленные таксономические и экологические исследования для проверки того, представляют ли эти две клады отдельные филогенетические линии.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Coetzee M. P. A. et al. Molecular identification and phylogeny of *Armillaria* isolates from South America and Indo-Malaysia //Mycologia. – 2003. – Т. 95. – №. 2. – С. 285-293.
2. Keča N. et al. Initial characterization of an unidentified *Armillaria* isolate from Serbia using LSU- IGS 1 and TEF- 1- α genes //Forest Pathology. – 2015. – Т. 45. – №. 2. – С. 120-126.
3. Hasegawa E. et al. Sequence-based identification of Japanese *Armillaria* species using the elongation factor-1 alpha gene //Mycologia. – 2010. – Т. 102. – №. 4. – С. 898-910.
4. Elías- Román R. D. et al. Incidence and phylogenetic analyses of *Armillaria* spp. associated with root disease in peach orchards in the State of Mexico, Mexico //Forest Pathology. – 2013. – Т. 43. – №. 5. – С. 390-401.
5. Maphosa L. et al. Phylogenetic relationships among *Armillaria* species inferred from partial elongation factor 1-alpha DNA sequence data //Australasian Plant Pathology. – 2006. – Т. 35. – №. 5. – С. 513-520.
6. Coetzee M. P. A. et al. Paleogene radiation of a plant pathogenic mushroom //PloS one. – 2011. – Т. 6. – №. 12. – С. e28545.
7. Coetzee M. P. A. et al. Phylogenetic analyses of DNA sequences reveal species partitions amongst isolates of *Armillaria* from Africa //Mycological Research. – 2005. – Т. 109. – №. 11. – С. 1223-1234.
8. Pildain M. B. et al. Molecular phylogeny of *Armillaria* from the Patagonian Andes //Mycological Progress. – 2009. – Т. 8. – №. 3. – С. 181.
9. Coetzee M. P. A. et al. Phylogenetic relationships of Australian and New Zealand *Armillaria* species //Mycologia. – 2001. – Т. 93. – №. 5. – С. 887-896.
10. Anderson J. B., Stasovski E. Molecular phylogeny of northern hemisphere species of *Armillaria* //Mycologia. – 1992. – Т. 84. – №. 4. – С. 505-516.
11. Chillali M. et al. Delineation of the European *Armillaria* species based on the sequences of the internal transcribed spacer (ITS) of ribosomal DNA //New Phytologist. – 1998. – Т. 138. – №. 3. – С. 553-561.

12. Terashima K. et al. Phylogenetic analysis of Japanese *Armillaria* based on the intergenic spacer (IGS) sequences of their ribosomal DNA //European Journal of Forest Pathology. – 1998. – T. 28. – №. 1. – C. 11-19.
13. Hasegawa E. et al. Sequence-based identification of Japanese *Armillaria* species using the elongation factor-1 alpha gene //Mycologia. – 2010. – T. 102. – №. 4. – C. 898-910.
14. Shaw C. G., Kile G. A. *Armillaria* root disease. – Forest Service, US Department of Agriculture, 1991. – №. 691.
15. Guillaumin J. J. et al. Geographical distribution and ecology of the *Armillaria* species in western Europe //European Journal of Forest Pathology. – 1993. – T. 23. – №. 6- 7. – C. 321-341.
16. Cruickshank M. G., Morrison D. J., Punja Z. K. Incidence of *Armillaria* species in precommercial thinning stumps and spread of *Armillaria ostoyae* to adjacent Douglas-fir trees //Canadian journal of forest research. – 1997. – T. 27. – №. 4. – C. 481-490.
17. Ferguson B. A. et al. Coarse-scale population structure of pathogenic *Armillaria* species in a mixed-conifer forest in the Blue Mountains of northeast Oregon //Canadian Journal of Forest Research. – 2003. – T. 33. – №. 4. – C. 612-623.
18. Bendel M., Kienast F., Rigling D. Genetic population structure of three *Armillaria* species at the landscape scale: a case study from Swiss *Pinus mugo* forests //Mycological research. – 2006. – T. 110. – №. 6. – C. 705-712.
19. Gregory S. C., Rishbeth J., Shaw III C. G. Pathogenicity and virulence //Agriculture handbook (USA). – 1991.
20. Rishbeth J. Infection cycle of *Armillaria* and host response //European Journal of Forest Pathology. – 1985. – T. 15. – №. 5- 6. – C. 332-341.
21. Lung-Escarmant B., Guyon D. Temporal and spatial dynamics of primary and secondary infection by *Armillaria ostoyae* in a *Pinus pinaster* plantation //Phytopathology. – 2004. – T. 94. – №. 2. – C. 125-131.
22. Baumgartner K., Coetzee M. P. A., Hoffmeister D. Secrets of the subterranean pathosystem of *Armillaria* //Molecular Plant Pathology. – 2011. – T. 12. – №. 6. – C. 515-534.

23. Heinzlmann R. et al. Latest advances and future perspectives in *Armillaria* research //Canadian Journal of Plant Pathology. – 2019. – T. 41. – №. 1. – C. 1-23.
24. Mayden R. L. et al. A hierarchy of species concepts: the denouement in the saga of the species problem //Systematics Association Special Volume. – 1997. – T. 54. – C. 381-424.
25. Taylor J. W. et al. Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi //Fungal genetics and biology. – 2000. – T. 31. – №. 1. – C. 21-32.
26. Jacobs K. A. et al. Identification of *Armillaria* species in California //Mycologia. – 1994. – T. 86. – №. 1. – C. 113-116.
27. Park K. H. et al. Re- evaluation of *Armillaria* and *Desarmillaria* in South Korea based on ITS/tef1 sequences and morphological characteristics //Forest Pathology. – 2018. – T. 48. – №. 6. – C. e12447.
28. Bérubé J. A., Dessureault M. Morphological studies of the *Armillaria mellea* complex: two new species, *A. gemina* and *A. calvescens* //Mycologia. – 1989. – T. 81. – №. 2. – C. 216-225.
29. Guillaumin J. J. et al. *Armillaria* and fungal rots of woody plants //Armillaria and fungal rots of woody plants. – 2005.
30. Korhonen K. Interfertility and clonal size in the *Armillar mellea* complex //Karstenia. – 1978. – T. 18. – №. 2. – C. 31-42.
31. Anderson J. B., Ullrich R. C. Biological species of *Armillaria mellea* in North America //Mycologia. – 1979. – T. 71. – №. 2. – C. 402-414.
32. Bérubé J. A. et al. Interfertility between *Armillaria cepistipes* and *A. sinapina* //Phytoprotection. – 1996. – T. 77. – №. 2. – C. 67-74.
33. Banik M. T., Burdsall Jr H. H. Assessment of compatibility among *Armillaria cepistipes*, *A. sinapina*, and North American biological species X and XI, using culture morphology and molecular biology //Mycologia. – 1998. – T. 90. – №. 5. – C. 798-805.
34. Taylor J. W. et al. Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi //Fungal genetics and biology. – 2000. – T. 31. – №. 1. – C. 21-32.
35. Kim M. S. et al. Characterization of North American *Armillaria* species: genetic relationships determined by ribosomal DNA sequences and AFLP markers //Forest Pathology. – 2006. – T. 36. – №. 3. – C. 145-164.

36. Tsykun T., Rigling D., Prospero S. A new multilocus approach for a reliable DNA-based identification of *Armillaria* species //Mycologia. – 2013. – T. 105. – №. 4. – C. 1059-1076.
37. Harrington T. C., Wingfield B. D. A PCR-based identification method for species of *Armillaria* //Mycologia. – 1995. – T. 87. – №. 2. – C. 280-288.
38. Kim M. S. et al. Characterization of North American *Armillaria* species by nuclear DNA content and RFLP analysis //Mycologia. – 2000. – T. 92. – №. 5. – C. 874-883.
39. Guo T. et al. Phylogenetic analyses of *Armillaria* reveal at least 15 phylogenetic lineages in China, seven of which are associated with cultivated *Gastrodia elata* //PLoS One. – 2016. – T. 11. – №. 5. – C. e0154794.
40. Ross-Davis A. L. et al. Advances toward DNA-based identification and phylogeny of North American *Armillaria* species using elongation factor-1 alpha gene //Mycoscience. – 2012. – T. 53. – №. 2. – C. 161-165.
41. Collins C. et al. Genomic and proteomic dissection of the ubiquitous plant pathogen, *Armillaria mellea*: toward a new infection model system //Journal of proteome research. – 2013. – T. 12. – №. 6. – C. 2552-2570.
42. Sipos G. et al. Genome expansion and lineage-specific genetic innovations in the forest pathogenic fungi *Armillaria* //Nature ecology & evolution. – 2017. – T. 1. – №. 12. – C. 1931-1941.
43. Koch R. A. et al. Resolved phylogeny and biogeography of the root pathogen *Armillaria* and its gasteroid relative, *Guyanagaster* //BMC evolutionary biology. – 2017. – T. 17. – №. 1. – C. 33.
44. Tsykun T. et al. Diversity and ecology of *Armillaria* species in virgin forests in the Ukrainian Carpathians //Mycological progress. – 2012. – T. 11. – №. 2. – C. 403-414.
45. Smith M. L., Bruhn J. N., Anderson J. B. The fungus *Armillaria bulbosa* is among the largest and oldest living organisms //Nature. – 1992. – T. 356. – №. 6368. – C. 428-431.
46. Dutech C. et al. Genetic analysis reveals efficient sexual spore dispersal at a fine spatial scale in *Armillaria ostoyae*, the causal agent of root-rot disease in conifers //Fungal biology. – 2017. – T. 121. – №. 6-7. – C. 550-560.

47. Lehtijärvi A. et al. *Armillaria ostoyae* in managed coniferous forests in Kastamonu in Turkey //Forest Pathology. – 2017. – T. 47. – №. 6. – C. e12364.
48. Baumgartner K., Rizzo D. M. Ecology of *Armillaria* spp. in mixed-hardwood forests of California //Plant disease. – 2001. – T. 85. – №. 9. – C. 947-951.
49. Cruickshank M. G., Morrison D. J., Punja Z. K. Incidence of *Armillaria* species in precommercial thinning stumps and spread of *Armillaria ostoyae* to adjacent Douglas-fir trees //Canadian journal of forest research. – 1997. – T. 27. – №. 4. – C. 481-490.
50. Dettman J. R., van der Kamp B. J. The population structure of *Armillaria ostoyae* and *Armillaria sinapina* in the central interior of British Columbia //Canadian Journal of Botany. – 2001. – T. 79. – №. 5. – C. 600-611.
51. Mesanza N., Patten C. L., Iturriza E. Distribution and characterization of *Armillaria* complex in Atlantic forest ecosystems of Spain //Forests. – 2017. – T. 8. – №. 7. – C. 235.
52. Schoch C. L. et al. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2012. – T. 109. – №. 16. – C. 6241-6246.
53. Nilsson R. H. et al. Intraspecific ITS variability in the kingdom Fungi as expressed in the international sequence databases and its implications for molecular species identification //Evolutionary bioinformatics. – 2008. – T. 4. – C. EBO. S653.
54. Skouboe P. et al. Phylogenetic analysis of nucleotide sequences from the ITS region of terverticillate *Penicillium* species //Mycological Research. – 1999. – T. 103. – №. 7. – C. 873-881..
55. O'Donnell K., Cigelnik E. Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are nonorthologous //Molecular phylogenetics and evolution. – 1997. – T. 7. – №. 1. – C. 103-116.
56. Hillis D. M., Dixon M. T. Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference //The Quarterly review of biology. – 1991. – T. 66. – №. 4. – C. 411-453.
57. Mekha N. et al. The intergenic spacer region of the ribosomal RNA gene of *Penicillium marneffeii* shows almost no DNA sequence diversity //Microbiology and immunology. – 2010. – T. 54. – №. 11. – C. 714-716.

58. Кочкина, Г. А. Галопсихротолерантные грибы рода *Geomyces* из криопэггов и морских отложений Арктики / Г. А. Кочкина, Н. Е. Иванушкина, В. Н. Акимов //Микробиология. – 2007. – Т. 76. – №. 1. – С. 39-47;
59. Sasikumar A. N., Perez W. B., Kinzy T. G. The many roles of the eukaryotic elongation factor 1 complex //Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA. – 2012. – Т. 3. – №. 4. – С. 543-555.
60. Kristensen R., Torp M., Kosiak B., Holst-Jensen A.. Mycol. Res. 2005;109(2):173–186.
61. Geiser D.M., Jimenez-Case M., Kang S., Makalowska I., Veeraraghavan N., Ward T., Zhang N., Kuldau G.A., O'Donnell K., Eur. J. Plant Pathol. 2004;110:473–479.
62. Yang, Z. Molecular phylogenetics: principles and practice / Z. Yang, B. Rannala //Nature Reviews Genetics. – 2012. – Т. 13. – №. 5. – С. 303-312
63. Baum D. A., Smith S. D. Tree thinking: an introduction to phylogenetic biology //Tree thinking: an introduction to phylogenetic biology. – 2012.
64. Yang Z., Rannala B. Molecular phylogenetics: principles and practice //Nature Reviews Genetics. – 2012. – Т. 13. – №. 5. – С. 303.
65. Zheng L. et al. Bacteria mediate oviposition by the black soldier fly, *Hermetia illucens* (L.), (Diptera: Stratiomyidae) //Scientific reports. – 2013. – Т. 3. – С. 2563.
66. Wiley E. O., Lieberman B. S. Phylogenetics: theory and practice of phylogenetic systematics. – John Wiley & Sons, 2011.
67. Lin, Y. Maximum likelihood phylogenetic reconstruction from high-resolution whole-genome data and a tree of 68 eukaryotes / Y. Lin, F. Hu, J. Tang //Biocomputing 2013. – С. 285-296;
68. Ronquist, F. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space / F. Ronquist, M. Teslenko, D. L. Ayres //Systematic biology. – 2012. – Т. 61. – №. 3. – С. 539-542;
69. de Queiroz A., Gatesy J. The supermatrix approach to systematics //Trends in ecology & evolution. – 2007. – Т. 22. – №. 1. – С. 34-41.
70. White T. J. et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics //PCR protocols: a guide to methods and applications. – 1990. – Т. 18. – №. 1. – С. 315-322.

71. Gardes M., Bruns T. D. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes- application to the identification of mycorrhizae and rusts //Molecular ecology. – 1993. – T. 2. – №. 2. – C. 113-118.
72. Kausserud H., Schumacher T. Outcrossing or inbreeding: DNA markers provide evidence for type of reproductive mode in *Phellinus nigrolimitatus* (Basidiomycota) //Mycological Research. – 2001. – T. 105. – №. 6. – C. 676-683.
73. Mulholland V. et al. Development and verification of a diagnostic assay based on EF- 1 α for the identification of *Armillaria* species in Northern Europe //Forest Pathology. – 2012. – T. 42. – №. 3. – C. 229-238.
74. Harrington T. C., Wingfield B. D. A PCR-based identification method for species of *Armillaria* //Mycologia. – 1995. – T. 87. – №. 2. – C. 280-288.
75. Okonechnikov K. et al. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit //Bioinformatics. – 2012. – T. 28. – №. 8. – C. 1166-1167.
76. Edgar R. C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput //Nucleic acids research. – 2004. – T. 32. – №. 5. – C. 1792-1797.
77. Kumar S., Stecher G., Tamura K. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets //Molecular biology and evolution. – 2016. – T. 33. – №. 7. – C. 1870-1874.
78. Gouy, M. SeaView version 4: a multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building / M. Gouy, S. Guindon, O. Gascuel //Molecular biology and evolution. – 2009. – T. 27. – №. 2. – C. 221-224;
79. Lanfear R. et al. PartitionFinder 2: new methods for selecting partitioned models of evolution for molecular and morphological phylogenetic analyses //Molecular biology and evolution. – 2017. – T. 34. – №. 3. – C. 772-773.
80. Burnham K. P., Anderson D. R. Multimodel inference: understanding AIC and BIC in model selection //Sociological methods & research. – 2004. – T. 33. – №. 2. – C. 261-304.
81. Kalyaanamoorthy S. et al. ModelFinder: fast model selection for accurate phylogenetic estimates //Nature methods. – 2017. – T. 14. – №. 6. – C. 587-589.
82. Nguyen, L. T. IQ-TREE: a fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies / L. T. Nguyen, H. A. Schmidt, B. Q. Minh //Molecular biology and evolution. – 2014. – T. 32. – №. 1. – C. 268-274.

83. Charif D., Lobry J. R. SeqinR 1.0-2: a contributed package to the R project for statistical computing devoted to biological sequences retrieval and analysis //Structural approaches to sequence evolution. – Springer, Berlin, Heidelberg, 2007. – С. 207-232.
84. Миронов А. Г., Кутафьева Н. П., Павлов И. Н. Морфологические признаки грибов комплекса *Armillaria mellea sensu lato* Циркумбореальной области //Хвойные бореальной зоны. – 2006. – Т. 23. – №. 3.
85. Anderson, J. B.; Stasovski, E., 1992: Molecular phylogeny of northern hemisphere species of *Armillaria* . Mycologia 84, 505–516.
86. Antonín, V., Tomšovský, M., Sedlák, P., Májek, T. and Jankovský, L. Morphological and molecular characterization of the *Armillaria cepistipes*–*A. gallica* complex in the Czech Republic and Slovakia //Mycological Progress. – 2009. – Т. 8. – №. 3. – С. 259-271.
87. Guo T. et al. Phylogenetic analyses of *Armillaria* reveal at least 15 phylogenetic lineages in China, seven of which are associated with cultivated *Gastrodia elata* //PLoS One. – 2016. – Т. 11. – №. 5. – С. e0154794.
88. Klopfenstein N. B. et al. Insights into the phylogeny of Northern Hemisphere *Armillaria*: Neighbor-net and Bayesian analyses of translation elongation factor 1- α gene sequences //Mycologia. – 2017. – Т. 109. – №. 1. – С. 75-91.
89. Mulholland V. et al. Development and verification of a diagnostic assay based on EF- 1 α for the identification of *Armillaria* species in Northern Europe //Forest Pathology. – 2012. – Т. 42. – №. 3. – С. 229-238.
90. Pavlov I. N. Biotic and abiotic factors as causes of coniferous forests dieback in Siberia and Far East //Contemporary problems of ecology. – 2015. – Т. 8. – №. 4. – С. 440-456.
91. Legrand P., Ghahari S., GUILLAUMIN J. J. Occurrence of genets of *Armillaria* spp. in four mountain forests in Central France: the colonization strategy of *Armillaria ostoyae* //New Phytologist. – 1996. – Т. 133. – №. 2. – С. 321-332.
92. Omdal D. W. et al. Variation of pathogenicity and virulence of isolates of *Armillaria ostoyae* on eight tree species //Plant disease. – 1995. – Т. 79. – №. 9. – С. 939-944.

93. Bendel M. et al. Incidence and distribution of *Heterobasidion* and *Armillaria* and their influence on canopy gap formation in unmanaged mountain pine forests in the Swiss Alps //European Journal of Plant Pathology. – 2006. – T. 116. – №. 2. – C. 85.
94. Gregory S. C., Watling R. Occurrence of *Armillaria borealis* in Britain //Transactions of the British Mycological Society. – 1985. – T. 84. – №. 1. – C. 47-55.
95. Morrison D. J. Rhizomorph growth habit, saprophytic ability and virulence of 15 *Armillaria* species //Forest Pathology. – 2004. – T. 34. – №. 1. – C. 15-26.
96. Prospero S., Holdenrieder O., Rigling D. Rhizomorph production and stump colonization by co- occurring *Armillaria cepistipes* and *Armillaria ostoyae*: an experimental study //Forest Pathology. – 2006. – T. 36. – №. 1. – C. 21-31.

Приложение

Таблица А.1 – Координаты сбора образцов и оценка их патогенности

Образцы	Место сбора	Идентифицированные виды	Координаты изолятов		Хозяева	Масштабы / Площадь усыхания, га	Патогенность <i>in situ</i> 1-низкая; 2 – средняя; 3- высокая	Патогенность <i>in vitro</i> (баллы)		
								¹ Гибель семян <i>Abies sibirica</i> на 90 суток вегетации (баллы)	² Некроз камбия черенков <i>Populus tremula</i> на 30 суток после инокуляции	³ Некроз корней <i>Picea abies</i> под влиянием метаболитов на 30 суток
1	Пугачево	<i>A.borealis</i>	56° 1.873'	92°34.403'	<i>Pinus sylvestris</i> L.	ед	2	2	3	2
2	Военное л-во	<i>A.cepistipes</i>	56°11.292'	92°12.365'	<i>Abies sibirica</i> Ledeb.	ед	1	1	1	1
3	Караулка	<i>A.borealis</i>	N55°59.684'	E92°38.156'	<i>Populus tremula</i> L.	0,2	2	2	2	2
4	Караулка,	<i>A.borealis</i>	55°59.211'	92°37.905'	<i>Betula pendula</i> Roth	ед	2	3	2	2
5	Караулка	<i>A.borealis</i>	N55°59.7'	E92°38.2'	<i>Populus tremula</i> L.	0,3	2	2	2	2
6	Караулка	<i>A.borealis</i>	N55°58.3'	E92°37.5'	<i>Populus tremula</i> L.	0.1	2	3	3	3
7	Дальний Восток, Сихотэ-Алинь	<i>A.gallica</i>	N44° 31,647'	E 135° 16,980'	<i>Abies nephrolepis</i> (Trautv. ex Maxim.) Maxim.	2.1	2	2	2	1
8	Бол. Анзас, Хакассия	<i>A.gallica</i>	N52°13.990'	E89°39.105'	<i>Abies sibirica</i> Ledeb.	ед	1	2	1	1
9	Дальний Восток, Сихотэ-Алинь	<i>A.ostoyae</i>	N44°38.142'	E135°10.465'	<i>Abies nephrolepis</i> (Trautv. ex Maxim.) Maxim.	4,8	3	3	2	2

10	Дальний Восток, Сихотэ-Алинь	<i>A.ostoyae</i>	N44°31.723'	E135°17.314'	<i>Abies nephrolepis</i> (Trautv. ex Maxim.) Maxim.	16	3	3	3	2
11	Дальний Восток, Сихотэ-Алинь	<i>A.cepistipes</i>	N44°31.7'	E135°17.3'	<i>Abies nephronlepis</i> (Trautv. Ex Maxim.) Maxim.	ед	1	1	1	0
12	Дальний Восток, Сихотэ-Алинь	<i>A.ostoyae</i>	N44°38.439'	E135°10.021'	<i>Picea jezoensis</i> (Siebold & Zucc.) Carrière	4,8	3	3	3	3
13	Дальний Восток, Сихотэ-Алинь	<i>A.cepistipes</i>	N44°31.637'	E135°16.513'	<i>Abies nephronlepis</i> (Trautv. Ex Maxim.) Maxim.	ед	1	1	0	0
14	Черный Июс	<i>A.cepistipes</i>	N54°30.643'	E88°49.912'	<i>Pinus sibirica</i> Du Tour	ед	1	2	1	2
15	Сисим	<i>A.borealis</i>	N54°38.714'	E93°18.074'	<i>Picea obovata</i> Ledeb.	16,1	3	3	3	3
16	Таштып-Матур	<i>A.borealis</i>	N52°26.098'	E88°56.428'	<i>Abies sibirica</i> Ledeb.	20.4	3	3	3	2
17	Дендрарий	<i>A.borealis</i>	N55°58.3'	E92°37.5'	<i>Pinus sibirica</i> Du Tour	ед	3	2	2	2
18	Пугачево	<i>A.borealis</i>	56°0.644'	92°36.342'	<i>Pinus sylvestris</i> L.	1,1	3	3	3	3
19	Сисим, Щетинкино	<i>A.borealis</i>	N54°31.347'	E93°23.904'	<i>Abies sibirica</i> Ledeb.	20,2	3	3	2	2
20	Сисим	<i>A.borealis</i>	N54°41.258'	E93°11.737'	<i>Abies sibirica</i> Ledeb.	14.6	3	3	2	3
21	Караулка	<i>A.borealis</i>	N55°58.1'	E92°37.1'	<i>Populus tremula</i> L.	0.1	2	3	3	3
22	Дальний Восток, Сихотэ-Алинь	<i>A.cepistipes</i>	N44°31.637'	E135°16.513'	<i>Abies nephronlepis</i> (Trautv. Ex Maxim.) Maxim.	ед	1	1	0	0
23	Сисим	<i>A.borealis</i>	N54°38.714'	E93°18.074'	<i>Picea obovata</i> Ledeb.	16,1	3	3	3	3
24	Караулка	<i>A.borealis</i>	55°58.348'	92°36.474'	<i>Betula pendula</i> Roth	ед.	2	2	2	2

25	Пугачево	<i>A.borealis</i>	56° 1.669'	92°34.331'	<i>Pinus sylvestris</i> L.	0,4	3	3	3	2
26	Пугачево	<i>A.borealis</i>	56° 1.727'	92°34.803'	<i>Populus tremula</i> L.	0,4	3	3	3	2
27	Сисим	<i>A.borealis</i>	N54°41.258'	E93°11.737'	<i>Abies sibirica</i> Ledeb.	31.8	3	3	2	2
28	Сисим	<i>A.borealis</i>	N54°41.021'	E93°12.368'	<i>Abies sibirica</i> Ledeb.	25.5	3	3	2	2

Таблица А.2 – Номера доступа маркеров каждого штамма из базы данных GenBank

Вид	Штамм	tef1	ITS	IGS	Источник
<i>A. tabescens</i>	HA11S5	HQ285906.1	HQ232292.1	HQ232284.1	Украина
	HA15S3	HQ285908.1	HQ232294.1	HQ232286.1	Украина
	HA12S5	HQ285907.1	HQ232293.1	HQ232285.1	Украина
	96_1_8	AB510804.1	AB510867.1	AB510823.1	Япония
	2006-20-01	AB510807.1	AB510887.1	AB510839.1	Япония
	96_3_3	AB510805.1	AB510868.1	AB510824.1	Япония
<i>A. mellea</i>	A_12	AB510801.1	AB510864.1	AB510820.1	Япония
	89-07	AB510796	AB510852.1	AB510808	Япония
	94-7	AB510799	AB510863	AB510819	Япония
	94-10-1	AB510798	AB510857	AB510813	Япония
	94-68	AB510803	AB510858	AB510814	Япония
	97-6	AB510797	AB510856	AB510812	Япония
	94_5	AB510802.1	AB510880.1	AB510833.1	Япония
	A_10	AB510800.1	AB510860.1	AB510816.1	Япония
<i>A. gallica</i>	NA4	AB510761.1	AB510881.1	AB510834.1	Япония
	E5	HQ285905.1	HQ232291.1	HQ232283.1	Франция
	Y11DS1	JN657484.1	JN657457.1	JN657430.1	Украина
	E4	JN657479.1	JN657452.1	JN657425.1	Франция
	E6	JN657480.1	JN657453.1	JN657426.1	Франция
	BRNM 706835	EU251390.1	EU257718.1	EU636240.1	Чехия
	HY2a	JN657482.1	JN657455.1	JN657428.1	Украина
	HY1	JN657481.1	JN657454.1	JN657427.1	Украина
	C1AS	JN657483.1	JN657456.1	JN657429.1	Украина
	NA13	AB510760.1	AB510890.1	AB510842.1	Япония
<i>A. cepistipes</i>	90_10_12	AB510790.1	AB510862.1	AB510818.1	Япония
	94_46_01	AB510793.1	AB510898.1	AB510849.1	Япония
	BRNM 695717	EU251396.1	EU257716.1	EU257710.1	Чехия
	S11AE	JN657478.1	JN657451.1	JN657424.1	Украина
	BRNM 706814	EU251395.1	EU257715.1	EU257709.1	Чехия
	B3	JN657472.1	JN657445.1	JN657418.1	Финляндия
	B2	HQ285902.1	HQ232288.1	HQ232280.1	Финляндия
	Y16AE	JN657476.1	JN657449.1	JN657422.1	Украина

	C13AE	JN657474.1	JN657447.1	JN657420.1	Украина
	B5	JN657473.1	JN657446.1	JN657419.1	Италия
	C19AS2	JN657475.1	JN657448.1	JN657421.1	Украина
	C5CS1	JN657477.1	JN657450.1	JN657423.1	Украина
<i>A. ostoyae</i>	C4	JN657487.1	JN657460.1	JN657433.1	Франция
	Y17DS	JN657488.1	JN657461.1	JN657434.1	Украина
	2002_66_03	AB510781.1	AB510896.1	AB510847.1	Япония
	NC8	AB510782.1	AB510897.1	AB510848.1	Япония
	C2	JN657486.1	JN657459.1	JN657432.1	Франция
	BRNM 706815	EU251400.1	EU257717.1	EU257711.1	Чехия
	HpAg1	JN657489.1	JN657462.1	JN657435.1	Украина
	C5	HQ285903.1	HQ232289.1	HQ232281.1	Франция
	88-01-19	AB510784	AB510859	AB510815	Япония
	91-01-10	AB510785	AB510865	AB510821	Япония
	D20	JN657490.1	JN657463.1	JN657436.1	Швейцария
<i>A. borealis</i>	A618	JN657496.1	JN657469.1	JN657442.1	Швейцария
	A1	JN657494.1	JN657467.1	JN657440.1	Финляндия
	A5	JN657495.1	JN657468.1	JN657441.1	Германия
	A722	JN657497.1	JN657470.1	JN657443.1	Швейцария
<i>A. nabsona</i>	00-16-4	AB510765.1	AB510883.1	AB510835.1	Япония
	NB4	AB510764	AB510900	AB510851	Япония
	00-4-4	AB510762	AB510876	AB510830	Япония
	00-3-1	AB510766.1	AB510899.1	AB510850.1	Япония
<i>A. sinapina</i>	96-7-1	AB510774.1	AB510873.1	AB510827.1	Япония
	05-7-1	AB510775	AB510886	AB510838	Япония
	05-13-2	AB510776	AB510884	AB510836	Япония
	05-46-1	AB510778	AB510889	AB510841	Япония
<i>G. necrorhizus</i>	RAK 31	KU289108.1	KU170948.1	KU254225.1	Гайана

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
Институт Фундаментальной Биологии и Биотехнологии
Кафедра геномики и биоинформатики

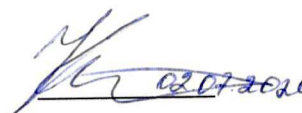
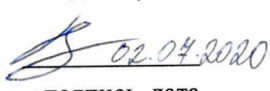
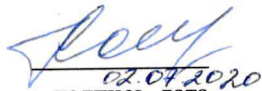
УТВЕРЖДАЮ
Заведующий кафедрой
И.Е.Ямских
подпись инициалы, фамилия
« 02 » 07 20 20 г.

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

"Молекулярная идентификация и филогения дереворазрушающих грибов
рода *Armillaria*, распространенных на территории РФ"

06.04.01 – Биология

06.04.01.06 – Геномика и биоинформатика

Научный руководитель	 подпись, дата	<u>проф., к. б. н.</u> должность, ученая степень	<u>Крутовский К.В.</u> инициалы, фамилия
Выпускник	 подпись, дата		<u>Колесникова А.И.</u> инициалы, фамилия
Рецензент	 подпись, дата	<u>с.н.с, д. б. н.</u> должность, ученая степень	<u>Литовка Ю.А.</u> инициалы, фамилия

Красноярск, 2020