УДК 576.26 + 504.054

Дяченко А.І., Гуща М.І., Шиліна Ю.В.,
Інститут клітинної біології і генетичної інженерії НАН України, Київ, Україна

ПЕРСПЕКТИВИ ВИКОРИСТАННЯ ФІТОПАТОГЕННИХ МІКРОМІЦЕТІВ ЯК ТЕСТ-ОБ'ЄКТІВ ДЛЯ МОНІТОРИНГУ СТАНУ НАВКОЛИШНЬОГО СЕРЕДОВИЩА

Показана принципова можливість використання фітопатогенних грибів як біологічних тест-систем. Для оцінки антропогенних змін середовища мікроміцети можуть бути застосовані як біоіндикатори на рівні екосистем і для біотестування в лабораторних умовах.

The opportunity of phytopathogenic fungi application as the biological test-system was shown. The micromycetes can be applied as bioindicators at ecosystem level and for biotesting in laboratory conditions.

У зв'язку із зростанням антропогенного навантаження на екосистеми пріоритетного характеру набувають дослідження, спрямовані на пошук тест-систем, які дали б змогу оцінити сумарний вплив забруднення на організм людини та на біоту. Особливо актуальною є проблема впровадження та розвитку системи біологічного моніторингу, головною задачею якого є дослідження стану біотичної складової екосистем, її реакцій на антропогенний вплив, вивчення залежностей типу „доза-ефект", а також пошук критеріїв визначення допустимого навантаження на природне середовище з урахуванням регіональних особливостей та визначення критичних ланок біосфери, які визначають ці рівні навантаження [1].

Для вирішення задач екологічного моніторингу розглядаються можливості застосування різних організмів – як прокаріот, так і еукаріот, що може забезпечити проведення швидких і дешевих випробовувань. Тест-об'єкти повинні поєднувати в собі такі характеристики, як швидка зміна поколінь та універсальний характер реакцій на дію різних факторів середовища. Перспективність використання мікроскопічних грибів в якості тест-об'єктів пов'язана насамперед з тим, що гриби належать до найпростіших еукаріот. Це дозволяє поєднувати легкість виконання експериментів з можливістю враховувати широке коло цитогенетичних ефектів, характерних саме для еукаріотичних клітин.

Гриби-макроміцети вже знайшли широке застосування як біоіндикатори забруднення природного середовища, оскільки здатні нагромаджувати різні полютанти, зокрема, важкі метали і радіонукліди. Аналіз коефіцієнтів накопичення важких металів і радіонуклідів показує, що гриби в лісових екосистемах є найбільш сильними накопичувачами цих елементів, проявляючи до деяких з них специфічну вибірковість. Зокрема, висока селективність у поглинанні радіоактивного ^{137}Cs та невеликий час життя плодових тіл (близько 10 діб) дозволили рекомендувати гриби як біоіндикатори радіонуклідного забруднення [2].

В останні десятиріччя для вирішення різних аспектів проблеми біотестування природних екосистем все частіше залучаються гриби-мікроміцети [3]. Значна увага приділяється ґрунтовим міксоміцетам як тест-організмам для якісної і кількісної оцінки дії різних видів антропогенного забруднення, розглядається можливість їх використання для екологічних прогнозів. Крім того, накопичення в середовищі

забруднювачів з мутагенними властивостями створює передумови для збільшення темпів мутагенезу, що у фітопатогенних мікроорганізмів може привести до появи нових рас з підвищеною агресивністю. У зв'язку з цим дикі та антропогенно змінені біоценози, де відбувається персистентне виникнення та резервація потенційно небезпечних патогенних рас грибів, потребують проведення постійного моніторингу популяцій патогенних грибів. При цьому самі патогенні гриби є зручним перспективним тест-об'єктом для біоіндикації екологічного неблагополуччя та біотестування різних полютантів як в умовах лабораторного експерименту, так і безпосередньо в природних умовах (*in situ*).

У зв'язку з цим була визначена мета даної роботи, а саме – аналіз та узагальнення даних стосовно можливостей застосування мікроміцетів в якості тест-систем для проведення екологічного моніторингу з використанням популяційно-біоценотичних, фізіолого-біохімічних та молекулярно-генетичних підходів.

Використання фітопатогенних мікроміцетів для моніторингу на біоценотичному та популяційному рівнях. В умовах природних екосистем ефективним показником для оцінки їх стану може бути визначення якісних та кількісних змін у складі грибних угрупувань – мікоценозів, що, як і фітоценози, є складовими біоценозів. Мікоценози утворені видами грибів, що належать до різних екобіоморф і мають специфічний характер трофічних відносин; їм властивий динамічний характер, що відображає зміни в сезонному, флуктуаційному та сукцесійному станах [4]. Основними факторами, які впливають на формування мікоценозів, крім субстрату, є хімічні та фізичні фактори середовища, особливості мікроклімату.

Мікологічний моніторинг включає встановлення видового складу грибів, дослідження систематичної та екологічної структури мікобіоти, зокрема, виявлення домінантних видів, видів-едифікаторів, рідкісних видів, реліктів, автохтонних та алохтонних видів [3]. Враховуються такі показники, як видове різноманіття, співвідношення чисельності різних видів, частота їх зустрічальності.

Зміни співвідношення у складі комплексів різних еколого-систематичних груп мікроміцетів, характерних для природних резерватів, можуть слугувати показником стану екосистем [3]. В якості можливих біоіндикаторів екологічного стану лісових екосистем запропоновано використовувати ксилотрофні мікроміцети [3]. У складі цієї еколого-систематичної групи грибів є сапротрофні та паразитичні, переважно аскові та незавершені мікроміцети, які внаслідок їх пластичності та високої чутливості до зовнішніх факторів можна використовувати для проведення моніторингу на популяційному рівні. Наявність в антропогенно трасформованих лісових екосистемах патогенних аскових грибів і збільшення їх чисельності є показником погіршення екологічної ситуації в екосистемах, змінених внаслідок антропогенного впливу [3].

Наприклад, порівняння рівнів репрезентативності аско- та дейтероміцетів у букових лісах Карпат в цілому та в заповідних і антропогенно змінених лісових масивах виявило значне збільшення репрезентативності дейтероміцетів в антропогенно порушених бучинах на фоні стабільного домінування аскоміцетів [3]. Для так званих грибів-екстремофілів, що були виділені з приміщень об'єкта „Укриття" Чорнобильської АЕС, властива редукція життєвого циклу (до циклу „спора-спора"), галуження міцелію за рахунок фрагментації первинних гіф та підвищена радіорезистентність [5]. В 30-кілометровій зоні відчуження Чорнобильської АЕС у 1986-1988 рр. при загальному зниженні у 2-3 рази вмісту у грунтах спор та грибного міцелію відмічали домінування темнозабарвленого міцелію [6]. Темнозабарвлені гриби продовжували домінувати у і 1989-1992 рр. [6]. Переважання темнозабарвлених ґрунтових грибів кваліфікується як промисловий меланізм міксоміцетів, і ця група грибів може бути біоіндикатором несприятливої екологічної ситуації [6].

Антропогенні фактори дуже істотно позначаються на поширенні опортуністичних грибів, причому переважно в бік збільшення їх вмісту в грунтах та інших субстратах [5, 11]. У міському середовищі угруповання грибів характеризуються специфічним видовим складом (спрощеною вертикальною структурою, збільшенням присутності опортуністичних видів грибів – потенційно патогенних для людини і рослин), що відрізняє їх від угрупувань мікроскопічних грибів природних біоценозів [8]. Комплекси грибів у грунті, на поверхні рослин, у приземному прошарку повітря в міському середовищі більш однорідні, їх коефіцієнти подібності вищі (0,3-0,7), ніж у природному середовищі (0,1-0,3). У міських екосистемах відзначалося збільшення частоти виявлення потенційно патогенних мікроскопічних грибів (представників родів *Aspergillus*, *Paecilomyces spp*., *Fusarium spp*., зокрема *F. oxysporum*, *F. verticillodies*) [8]. Виживанню популяцій одного з найбільш варіабельних і шкодочинних видів грибів *F. oxysporum* у різноманітних умовах сприяє його високий адаптаційний потенціал, значний ступінь надійності, низький рівень спеціалізації [9].

Радіонуклідне забруднення може впливати на склад популяцій деяких фітопатогенних грибів, про що свідчать дані про расовий склад збудника стеблової іржі пшениці *Puccinia graminis tritici* в

умовах 30-кілометрової зони відчуження ЧАЕС. Показано, що "чорнобильська" популяція відзначається підвищеною, порівняно з контрольними ділянками, зустрічальністю вірулентних клонів збудника [10].

Таким чином, результати дослідження характеристик різних груп мікроміцетів в природних та антропогенно змінених екосистемах свідчать про можливість застосування мікроміцетів, зокрема фітопатогенних, для оцінки ступеня антропогенного навантаження на біоту. Раннє виявлення відхилень від нормальних співвідношень у складі комплексів різних еколого-систематичних груп мікроміцетів, характерного для природних резерватів, дає можливість прогнозувати ситуацію та вживати практичні заходи для усунення негативного антропогенного пресингу.

Можливості застосування фітопатогенних грибів як тест-об'єктів із застосуванням фізіолого-біохімічних параметрів. В якості параметрів при біотестуванні різних факторів із застосуванням мікроміцетів можуть бути використані такі характеристики, як порушення життєвого циклу мікроміцетів, редукція окремих його стадій, модифікації біологічних властивостей (зокрема, зміни патогенності) тощо. В умовах лабораторного тестування впливу різних факторів (іонізуюче випромінювання, УФ-Б) ефективним є використання тесту на проростання спор та подовження ростових трубок (первинних гіф) [11, 12].

Відомо, що у мікроміцетів в якості колонієутворюючих одиниць при безстатевому розмноженні виступають спори (конідії), а при вегетативному – фрагменти міцелію. Екологічні оптимуми для безстатевого і вегетативного розмноження мікроміцетів можуть відрізнятися [13], і це дає можливість індикації відповідних умов середовища.

При характеристиці впливу факторів середовища на ріст грибів прийнято використовувати як найбільш чутливий показник оцінку рівня проростання грибних спор [13]. Суспензію конідій можна висівати на агаризоване середовище і після інкубації визначати кількість пророслих спор і довжину первинної росткової гіфи. Для вивчення проростання спор краплю спорової суспензії, одержаної шляхом змиву з культури, розподіляють на поверхні скелець з агаризованим середовищем, інкубують і підраховують частку пророслих спор [13]. Важливим параметром, що характеризує ріст грибів, є також радиальна швидкість росту колоній на поверхні агаризованого середовища (на середовище наносять спорову суспензію, вимірюють діаметр колоній в динаміці) [14].

Життєздатність фрагментів міцелію оцінюють за їх здатністю до росту на твердих поживних середовищах за показником частки фрагментів, що ростуть, (у %) для кожного класу довжин фрагментів міцелію, за приростом довжин фрагментів та за величиною затримки початку їх росту [13]. Екологічні фактори впливають на життєздатність фрагментів грибного міцелію різної довжини, і вплив факторів середовища можна оцінювати за „критичною величиною фрагментів" міцелію, здатних до росту за даних умов [13]. Найбільш чутливими є дрібні фрагменти міцелію [13]. Встановлено, що забруднення важкими металами може здійснювати на ріст різних видів грибів не тільки інгібуючий, але при низьких концентраціях і певний стимулюючий вплив. Зокрема, внесення в середовище кадмію в концентраціях 2, 10 і 100 мг/л викликало підвищення життєздатності фрагментів міцелію *Alternaria alternata* і *Mucor hiemalis* малих та середніх розмірів (85-200 мкм) [13]. Показано стимуляцію росту первинних гіф фітопатогенного гриба *Fusarium solani* після опромінення спор у малих дозах УФ-В (0,1-0,5 кДж/м^2) [12].

У фітопатогених грибів, крім ростових реакцій, можна оцінювати також зміну їх вірулентності та агресивності [11, 12]. Показано, що вирощування культур фітопатогенних грибів в умовах хронічного опромінення протягом 1 генерації (14 діб) зумовило зміну їх агресивності, яка мала подібний характер і у *F. solani* і у *Botrytis cinerea*. При потужності дози опромінення $1{,}3 \cdot 10^{-8}$ Гр/с, коли загальна накопичена доза за генерацію становила близько 0,015 Гр, спостерігали достовірне зростання агресивності обох культур порівняно з контролем. В умовах, коли чисті культури фітопатогенних грибів *F. solani* та *B. cinerea* протягом 14 діб (1 генерація) зазнавали дії гамма-випромінення з низькою потужністю дози ($1{,}3\text{-}10{,}5 \cdot 10^{-8}$ Гр/с), формувалися спори, які давали початок культурам з підвищеною, порівняно з контролем, агресивністю, яка проявлялася, принаймні, протягом 5 діб з моменту проростання конідій.

Таким чином, при застосуванні в якості тест-об'єктів мікроміцетів для характеристики стресових факторів можна використовувати в якості параметрів проростання спор, ріст первинних гіф і фрагментів міцелію, агресивність. При цьому слід оцінювати саме зміну цих параметрів відносно контролю, оскільки вплив стресорів на фітопатогенні гриби може обумовлювати у них як інгібуючі, так і стимулюючі ефекти. Негативний вплив факторів може проявлятися не тільки у пригніченні, але й у стимуляції розвитку патогенних грибів.

Молекулярно-генетичні методи. Мікроскопічні гриби давно використовуються в якості тест-об'єктів для оцінки мутагенності різних хімічних сполук [15, 16]. Для тестування мутагенів найчастіше застосовують такі найбільш вивчені види міксоміцетів, як *Saccharomyces cerevisiae,*

Schizosaccharomyces pombe, Neurospora crassa, Aspergillus nidulans, і ряд параметрів – хромосомні аберації (нерозходження, втрата хромосом, делеції, дуплікації), генні мутації (прямі і зворотні), мітотичні рекомбінації та ін. Наприклад, для обліку мітотичного кросинговеру використовують штами дріжджів *S.cerevisiae* – компаунди по мутантних алелях генів *ade2* і *trp5* [16].

В природних умовах під впливом різних факторів можливі перебудови генетичної структури популяцій фітопатогенних грибів. Важливою задачею є картування та моніторинг генів вірулентності в популяціях патогенів. Молекулярно-генетичні маркери дозволяють одержувати інформацію про поліморфізм генів і досліджувати, які варіанти окремих генів та генних комплексів набувають переважного поширення в організмів за певних умов. Були створені ефективні тест-системи на рівні продуктів генів (білковий поліморфізм) та на рівні геному (поліморфізм ДНК) [17]. Поліморфні послідовності ДНК використовуються для маркування генів, ділянок хромосом, геному, особин, популяцій і видів при вирішенні різних задач. ДНК-поліморфізм виявляють за допомогою гібридизації по Саузерну або за допомогою полімеразної ланцюгової реакції – ПЛР (ПЛР мікросателітних локусів *SSRP* – та ПЛР анонімних послідовностей ДНК – *RAPD*, Randomly Amplified Polymorphic DNA – випадково амфліфікована поліморфна ДНК; *ISSR* – інвертовані повтори; *AFLP* – поліморфізм в сайтах рестрикції) [Глазко, Глазко, 2003].

В роботі [27] показана можливість вивчення генетичної структури ґрунтових популяцій міцеліального гриба *F. oxysporum* за допомогою методу ПЛР з використанням універсальних праймерів.

На основі *RAPD* при використанні в якості праймерів коротких послідовностей ретротранспозонів виник метод *IRAP*, *ISSR – RE-MAP*, в якому використовуються обидва варіанти праймерів – з ретротранспозона і мікросателіта, *AFLP – SSAP*, заснованому на послідовностях ретротранспозонів і поліморфізм мікросателітних локусів *SSR – RBIP*, в якому використовують праймери, що фланкують сайти ретротранспозиції [Глазко, Глазко, 2003]. Геноми фітопатогенних грибів містять значну кількість мікросателітних послідовностей і ретротранспозонів [18-22, 28]. Наприклад, в геномі штамів *F. oxysporum* присутні в різній кількості копії мобільних елементів, що належать до кількох груп і є потенційним джерелом каріотипічної нестабільності цих штамів (транспозони *impala* групи *Tc-mariner*, *Tfo* групи *hAT,* транспозон *Foxy* группи *SINE*) [23-25]. Патогенні штами *Magnaporthe grisea* містять

Література

1. Горова А.І., Скворцова Т.В., Клімкіна І.І., Павличенко А.В., Бучавий Ю.В. Цитогенетичний моніторинг довкілля та здоров'я людини // Вісн. Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів. – 2005. – Т. 3, № 1-2. – С. 36-47.
2. Щеглов А.И., Цветнова О.Б. Грибы – биоиндикаторы техногенного загрязнения // Природа. – 2002. – № 11. – С.13-16.
3. Дудка І.О., Мережко Т.О., Гайова В.П. Мікологічний моніторинг як засіб оцінки і прогнозування фітосанітарного стану лісових екосистем // Укр. ботан. журн. – 1994. – Т. 51, № 6. – С. 53-59.
4. Таслахчъян М.Г., Нанагюлян С.Г. Современные представления о структуре микоценозов // Микол. и фитопатол. – 1996. – Т. 30, № 4. – С. 69-74.
5. Жданова Н.Н., Захарченко В.А., Тугай Т.И., Карпенко В.И., Наконечная Л.Т., Павличенко А.К., Желтоножский В.А., Жидков А.В., Сенюк О.Ф. Грибное поражение помещений объекта "Укрытие" // Проблеми безпеки атомних електростанцій і Чорнобиля. – 2005. – Вип. 3, Ч. 1. – С. 78-86.
6. Рабочие материалы Международной конференции "Десятилетие после Чернобыля: воздействие на окружающую среду и дальнейшие перспективы". – Вена, МАГАТЭ, 1996. – С. III-1 – III-20.
7. Гуща М., Дяченко А., Шиліна Ю., Дмитрієв О. Вплив хронічного опромінення з малими потужностями доз на ріст та агресивність фітопатогенних грибів // Науковий вісник УжНУ. Серія: Біологія. – 2001. – Випуск № 10. – С. 133-135.
8. Марфенина О.Е., Каравайко Н.М., Иванова А.Е. Особенности комплексов микроскопических грибов урбанизированных территорий // Микробиология. – 1996. – Т. 65, № 1. – С. 119-124.
9. Курченко И.Н., Жданова Н.Н., Элланская И.А., Соколова Е.В. Особенности роста штаммов Fusarium oxysporum (Schlecht) Snyd. et Hans., выделенных из почвы и пораженных зерновых культур // Микробиол. журн. – 1996. – Т. 58, № 5. – С. 35-44.
10. Дмитриев А.П., Гуща Н.И., Крыжановская М.С. Популяционные изменения фитопатогенных грибов в Чернобыльской зоне отчуждения // Фактори експериментальної еволюції. – Київ: Аграрна наука, 2004. – Т. 2. – С. 126-131.
11. Марфенина О.Е. Опасные плесени в окружающей среде // Природа. – 2002. – № 11. – С. 7-12.
12. Гуща М.І., Дяченко А.І., Дмитрієв О.П. Вплив УФ-В-опромінення на ростові характеристики фітопатогенного гриба Fusarium solani // Збірник наукових праць Інституту ядерних досліджень. – 2002. – № 2 (8).- С. 159-161.
13. Иванова А.Е., Марфенина О.Е. Влияние экологических факторов на способность к росту фрагментов мицелия и прорастания спор микроскопических грибов // Микробиология. – 2001. – Т. 70, № 2. – С. 235-240.
14. Иванушкина Н.Е., Мирчинк Т.Г. Использование радиальной скорости роста микромицетов в качестве экологического показателя // Микробиология. – 1982. – Т. 51, № 6. – С. 941-944.
15. Дубинин Н.П. Новое в современной генетике. – М.: Наука, 1986. – 222 с.
16. Мутационный процесс у грибов / Захаров И.А., Ковальцова С.В., Кожина Т.Н., Федорова И.В., Яровой В.Ф. – Л.: Наука, 1980. – 287 с.
17. Глазко В.И., Глазко Г.В. Введение в генетику: биоинформатика, ДНК-технология, генная терапия, ДНК-экология, протеомика, метаболика. – К.: КВІЦ, 2003. – 640 с.
18. Backlund J. E., Szabo L. J. Physical characteristics of the ge-

nome of the phytopathogenic fungus Puccinia graminis // Curr. Genet. – 1993. – 24, № 1-2. – P. 89-93.
19. Kim N.S., Park N.I., Kim S.H. et al. Isolation of TC/AG repeat microsatellite sequences for fingerprinting rice blast fungus and their possible horizontal transfer to plant species.// Mol. Cells. – 2000. – 10, № 2. – P. 127-134.
20. Dobinson K.F., Harris R.E., Hamer J.E. Grasshopper, a long terminal repeat (LTR) retroelement in the phytopathogenic fungus Magnaporthe grisea. // Mol. Plant Microbe Interact. – 1993. – 6, № 1. – P. 114-126.
21. Zhu P., Oudemans P. V. A long terminal repeat retrotransposon Cgret from the phytopathogenic fungus Colletotrichum gloeosporioides on cranberry. // Curr. Genet. – 2000. – 38, № 5. – P. 241-247.
22. Diolez A., Marches F., Fortini D., Brygoo Y. Boty, a long-terminal-repeat retroelement in the phytopathogenic fungus Botrytis cinerea. // Appl. Environ. Microbiol. – 1995. – 61, № 1. – P. 103-108.
23. Дьяков Ю.Т. Популяционная биология фитопатогенных грибов. – М.: ИД “Муравей”, 1998. – 384 с.
24. Aureacute;lie Hua-Van, Jean-Michel Daviegrave;re, Kaper F. et al. Genome organization in Fusarium oxysporum: clusters of class II transposons // Current Genetics. – 2000. – 37, № 5. – P. 339-347.
25. Daviere J. M., Langin T., Daboussi M. J. Potential role of transposable elements in the rapid reorganization of the Fusarium oxysporum genome // Fungal Genet. Biol. – 2001. – 34, № 3. P. 177-192.
26. Kachroo P., Ahuja M., Leong S.A., Chattoo B.B. Organisation and molecular analysis of repeated DNA sequences in the rice blast fungus Magnaporthe grisea. // Curr. Genet. – 1997. – 31, № 4. – P. 361-369.
27. Булат С.А., Мироненко Н.В., Жолкевич Ю.Г. Генетическая структура почвенной популяции гриба Fusarium oxysporum Schlechtend.: Fr.: молекулярная реиндентификация вида и генетическая дифференциация изолятов методом полимеразной цепной реакции с универсальными праймерами (УП-ПЦР) // Генетика. – 1995. – Т. 31, № 3. – С. 315-323.
28. Шилина Ю.В., Гуща Н.И. Генетическая нестабильность и ее