

КРАТКОЕ СООБЩЕНИЕ

УДК 581.2: 630*844: 58.035.7

ЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ ДРЕВЕСИНЫ КАК ПОКАЗАТЕЛЬ ЗАРАЖЕННОСТИ ДЕРЕВА АРМИЛЛЯРИОЗНОЙ ГНИЛЬЮ

А. П. Пузырь, С. Е. Медведева

Институт биофизики СО РАН – Обособленное подразделение ФИЦ КНЦ СО РАН
660036, Красноярск, Академгородок, 50/50

E-mail: apuzyr@mail.ru, ccibso@mail.ru

Поступила в редакцию 11.04.2016 г.

Диагностика инфекционных болезней деревьев основана на анатомо-морфологических характеристиках повреждения дерева и определении возбудителей этого процесса. При изучении заболевания деревьев, вызванных грибными патогенами, необходимым условием является описание морфологических характеристик плодовых тел, т. е. проведение исследований причины заболевания деревьев возможно только в ограниченный промежуток времени года, определяемый периодом образования плодовых тел грибов. Следует учитывать, что не каждый год природные условия благоприятны для формирования базидиом. При отсутствии плодовых тел диагностика возбудителя болезни усложняется. В этом случае для выяснения причины заболевания требуются дополнительные мероприятия по выращиванию плодовых тел или получению чистой культуры мицелия гриба. Согласно литературным данным, грибы рода *Armillaria* являются наиболее распространенными дереворазрушителями во всех лесных зонах, а также в ботанических садах, парках, городских насаждениях и на частных садовых участках. В отличие от других грибов, поражающих древесину деревьев, мицелий грибов комплекса *Armillaria mellea sensu lato* обладает биолюминесценцией. Эта особенность позволяет идентифицировать их среди других базидиомицетов, произрастающих на территории России. В данной статье на основании экспериментальных результатов обсуждается способ определения зараженности деревьев корневыми патогенами комплекса *Armillaria mellea s.l.* путем регистрации люминесценции образцов древесины. Показано, что регистрацию люминесцентного сигнала можно проводить в любое время года, а не только в вегетационный период. Делается предположение о возможности выявления деревьев, больных армилляриозом, при отсутствии плодовых тел патогенных грибов рода *Armillaria*. Использование предлагаемого способа, вероятно, может позволить проводить раннюю диагностику зараженности дерева.

Ключевые слова: армилляриоз, биолюминесценция грибницы, *Armillaria mellea sensu lato*.

DOI: 10.15372/SJFS20160613

ВВЕДЕНИЕ

Грибы рода *Armillaria* обнаруживаются по всему миру (Бурова, 1991). В России они являются наиболее распространенными дереворазрушителями во всех лесных зонах, а также встречаются в ботанических садах, парках, городских насаждениях и на частных садовых участках (Селочник, 2008). До настоящего времени нет однозначного ответа, какую роль эти грибы выполняют в лесных сообществах, яв-

ляются ли опять вторичными (Соколов, 1964; Иванов, 1981; Федоров, 1984; Селочник, 1992) или первичными (Baumgartner, Rizzo, 2001; Schwarze, Ferner, 2003) патогенами. Независимо от точки зрения на роль грибов рода *Armillaria* при гибели деревьев желательным иметь информацию о наличии или отсутствии зараженности лесного массива или конкретного дерева.

В настоящее время диагностика инфекционных болезней осуществляется по анатомо-морфологическим нарушениям у деревьев, морфо-

логическим и репродуктивным образованиям возбудителей (Татаринцев, Скрипальщикова, 2015). Таким образом, важным критерием зараженности деревьев является наличие плодовых тел патогенных грибов. При их отсутствии диагностика усложняется, поэтому предлагаются способы, позволяющие получать плодовые тела или чистые культуры. Например, с этой целью на исследуемой территории в начале вегетационного периода в очагах куртинного усыхания и примыкающих древостоях прорывают траншеи глубиной до 50 см. Дополнительно обкапывают пни. Сверху траншеи накрывают непрозрачным перфорированным полиэтиленом, ветвями, мхом, травой, древесным опадом. К концу вегетационного периода на корневых системах и комлевых частях формируются плодовые тела (Павлов и др., 2008).

С помощью метода выкопанных траншей показана определяющая роль корневых патогенов (*Armillaria mellea* s.l., *Heterobasidion annosum* s.l., *Phellinus sulphurascens* Pilat.) в куртинном усыхании ленточных Минусинских боров, сосновых лесов зеленой зоны г. Красноярска, темнохвойных лесов Восточного Саяна. В результате раскопки корней в здоровых древостоях при наличии опенки на пнях лиственных деревьев установлено частичное повреждение корней сосны обыкновенной и сибирской, пихты сибирской и ели сибирской (Павлов, 2013). Однако вырытые траншеи не гарантируют получения плодовых тел в конце вегетационного сезона, что связывают с сильной зависимостью развития базидиом от влажности (Павлов и др., 2011). В случае отсутствия плодовых тел на корнях, находящихся в выкопанных траншеях, предлагается выделение чистых культур грибов с раскопанных корней, погибших и ослабленных деревьев, в очагах усыхания (Павлов и др., 2010).

Существует менее трудоемкий способ, заключающийся в бурении стволов у шейки корня и на высоте груди возрастным буром Пресслера. По кернам определяют возраст деревьев, присутствие гнилей с уточнением их типа, стадии развития и положения в стволе. Часть кернов помещают в стерильные пробирки для последующего выращивания чистых культур и определения вида возбудителя, вызвавшего гниль (Стороженко, Коткова, 2013).

Отличительной особенностью мицелия грибов комплекса *Armillaria mellea* s.l. является биолюминесценция (Medvedeva et al., 2014;

Mihail, 2015), что позволяет идентифицировать их среди других грибов, произрастающих на территории России.

Цель данной работы – оценка возможности использования люминесценции грибницы (мицелия) в древесине как маркера на заражение деревьев армилляриозной гнилью.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследовали образцы древесины из стволов трех деревьев березы *Betula pendula* (Betulaceae), находящихся в березовой роще Академгородка Красноярского научного центра СО РАН. Выбор объектов исследования определяли на основе следующих наблюдений. На объекте № 1 (дерево длиной 10 м, лежащее на земле) в августе 2015 г. в районе комля обнаружены плодовые тела, поэтому была полная гарантия наличия мицелия в прилегающей древесине. Объекты № 2 и 3 не имели плодовых тел, однако объект № 2 имел сломанную вершину, погиб несколько лет назад, поэтому можно было предположить, что он заражен мицелием. Объект № 3 – ближайшее живое дерево к объекту № 2, и в случае наличия мицелия в объекте № 2 представлялось интересным проверить возможность обнаружения мицелия в древесине живого дерева.

У деревьев брали образцы древесины, помещали их в чашки Петри (диаметром 35 мм) или в пробирки МСТ-200-С (Axxygen Scientific, Inc., USA), которые для измерения интенсивности и динамики люминесцентного сигнала непосредственно устанавливали в адаптеры камеры образцов люминометра Glomax® 20/20 (Promega, USA). Интенсивность световой эмиссии мицелия регистрировали в относительных световых единицах.

Визуализацию люминесцентных областей образцов осуществляли с помощью системы видеодокументации Gel Doc XR Imaging System (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA). Система видеодокументации состоит из управляющего компьютера и камеры образцов (Universal Hood II), которая экранирована от внешнего света, но имеет внутренние источники освещения (люминесцентные и ультрафиолетовые лампы). В Universal Hood II встроена высокочувствительная цифровая камера. Система предназначена для регистрации изображения и исследования электрофорезных гелей, колоний на твердых питательных средах и других объектов. Программное обеспечение Quantity One® поз-

воляет обрабатывать получаемые изображения и анализировать широкий спектр биологических данных об объекте, в том числе хемилюминесценцию, флуоресценцию, радиоактивность, цвет окрашенных образцов. В данных исследованиях при включенных лампах дневного света проводили регистрацию изображения образцов в видимом свете, при выключенных лампах регистрировали области образцов, обладающие люминесценцией. Условия регистрации люминесцентного сигнала: диафрагма максимально открыта, время накопления сигнала до 300 с.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Как и ожидалось, образцы древесины объекта № 1 (на котором выросли плодовые тела армиллярии) обладают люминесценцией. Применение системы видеодокументации позволяет визуализировать люминесцентные области образца древесины (рис. 1, б).

На основании изображений рис. 1, б следует, что ближайшие (соседние) участки древесины могут существенно отличаться по интенсивности люминесценции. Это является важной характеристикой, так как означает, что грибница неравномерно прорастает в объеме древесины и есть вероятность, что от некоторых образцов больного дерева не будет регистрироваться люминесцентный сигнал. В таком случае может быть сделано неверное заключение об отсутствии заражения.

Другим важным условием является промежуток времени после взятия образцов, в течение которого сохраняется достаточная для регистра-

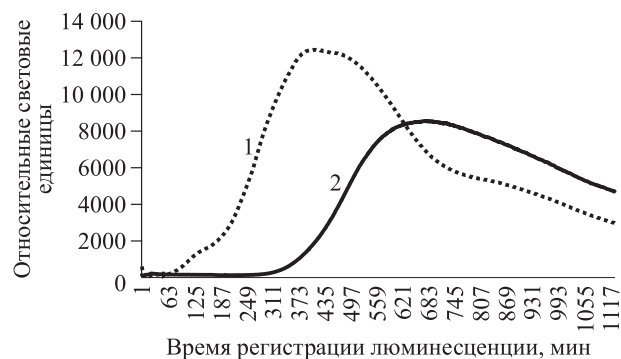


Рис. 2. Динамика люминесцентных сигналов образцов объекта № 1: 1 – октябрь 2015 г.; 2 – январь 2016 г.

ции интенсивность люминесценции. Этот параметр может являться определяющим фактором при использовании данного подхода в последующих исследованиях, когда, например, требуется некоторое время для транспортировки образцов от объектов исследования (деревья пробной площади) на стационар (где установлен люминометр), так как пробная площадь и стационар могут находиться на значительном расстоянии друг от друга.

Динамика люминесцентных сигналов образцов древесины, взятых у одного дерева (в данном случае объект № 1) из близко расположенных участков ствола в осеннее (октябрь 2015 г.) и зимнее (январь 2016 г.) время года, представлена на рис. 2. Независимо от времени года отмечен низкий первоначальный уровень люминесценции, который увеличивается, достигает максимума и затем идет на спад. В осенний период (см. рис. 2, линия 1) уровень люминесцентного сигнала достигает максимального значения

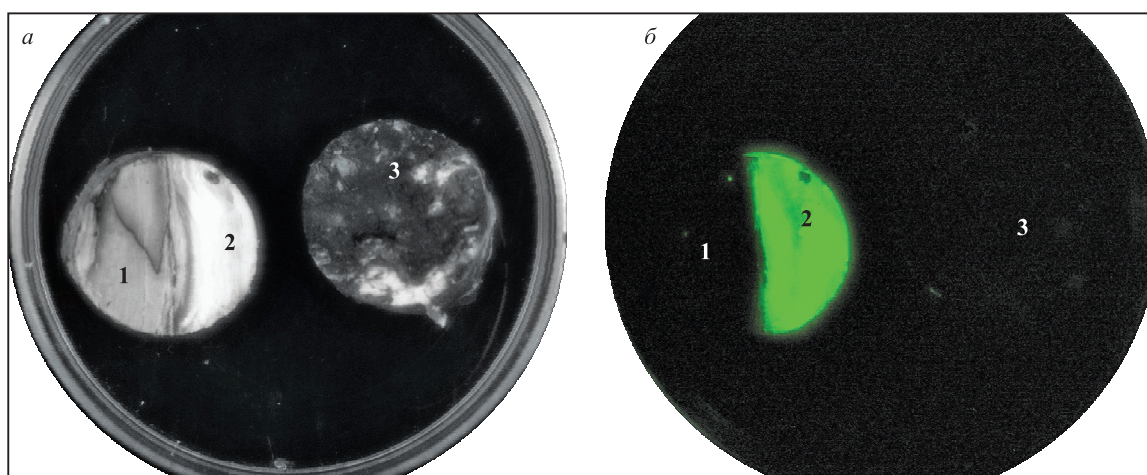


Рис. 1. Образцы объекта № 1 (август 2015 г.): а – изображение в видимом свете; б – люминесценция мицелия в темноте. 1 – не люминесцентная область древесины; 2 – люминесцентная область древесины; 3 – отсутствие люминесценции со стороны коры.

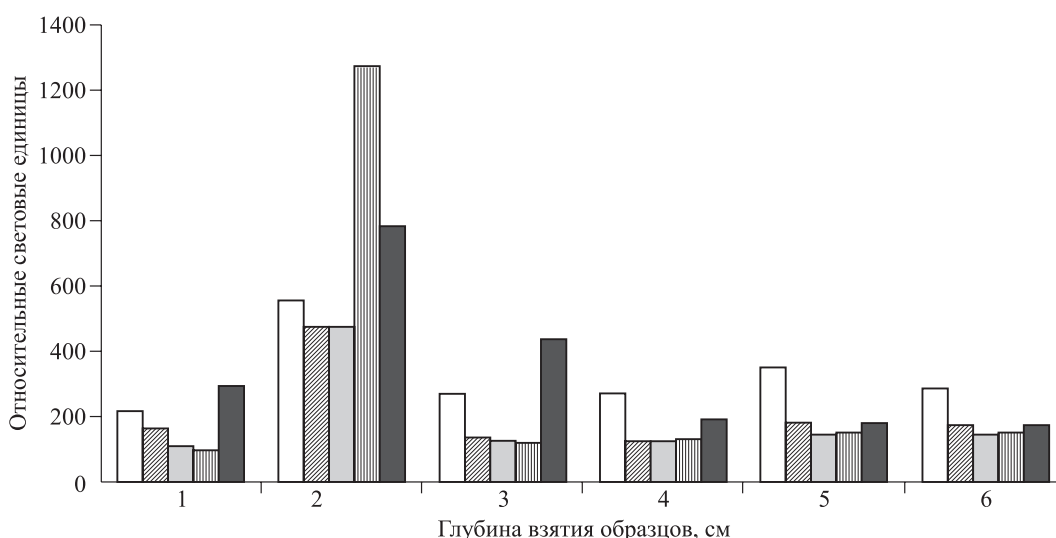


Рис. 3. Распределение люминесценции в радиальном направлении (объект № 1).

примерно через 7 ч, а в зимний (см. рис. 2, линия 2) – через 11 ч. Можно предположить, что увеличение времени, необходимого для достижения максимального значения при развитии люминесценции образца, взятого в зимний период, связано с физиологическими процессами, произошедшими в метаболизме грибницы, которые позволяют мицелию пережить период низких температур (в январе 2016 г. ночная температура опускалась до $-25 \dots -30 \text{ }^\circ\text{C}$, а дневная – до $-15 \dots -25 \text{ }^\circ\text{C}$). Следовательно, образцы древесины независимо от времени года длительное время сохраняют высокий уровень люминесценции, что позволяет в этот временной период проводить их транспортировку от объектов исследования до измерительного прибора.

Так как плодовые тела гриба наблюдались только возле комля объекта № 1, целесообразно было выяснить возможность регистрации люминесценции на других участках ствола. У всех образцов, взятых по длине ствола с интервалом в 1 м, зарегистрированы люминесцентные сигналы (данные не приводятся). Следовательно, древесина объекта № 1 содержит грибницу опенка по всей длине ствола, а люминесценция может свидетельствовать о заражении древесины на участках ствола дерева без плодовых тел *Armillaria mellea s.l.*

Результаты регистрации люминесценции пяти образцов, взятых в радиальном направлении, представлены на рис. 3. Из них следует, что для объекта № 1 оптимален забор образца с глубины до 2–3 см, где регистрируется максимальный уровень люминесценции.

Для выяснения возможности определения мицелиального заражения древесины деревьев, на которых в вегетационный период 2015 г. не обнаружены плодовые тела армиллярии, взяли образцы с объектов № 2 и 3. Результаты регистрации люминесценции приведены на рис. 4. Из них следует, что люминесцентный сигнал наблюдался в древесине погибшего дерева (объект № 2). В живом дереве (объект № 3), растущем в непосредственной близости от зараженного (расстояние между стволами у земли составляет примерно 15–20 см), люминесценция не зарегистрирована. Причиной этого может быть как отсутствие заражения, так и «неудачное» взятие образца из области ствола, где мицелий еще не пророс.

Таким образом, на настоящий момент однозначный ответ на вопрос о возможности обнаружения поражения древесины живых деревьев грибницей комплекса *Armillaria mellea s.l.* в результате регистрации люминесцентного сигнала не получен.



Рис. 4. Динамика люминесцентного сигнала образцов древесины объектов № 2 и 3 (ноябрь 2015 г.).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Согласно приведенным результатам, регистрация биолюминесценции древесины, зараженной армилляриозной гнилью, возможна в любое время года, является экспрессной и менее трудоемкой по сравнению с методом траншей или при получении чистой культуры. Однако эти данные надо рассматривать как предварительные. Применение предложенного подхода в реальных лесных массивах возможно в том случае, если будет показана корреляция результатов по регистрации люминесценции с данными, полученными общепринятыми методами изучения армилляриоза. В случае успеха, вероятно, удастся разработать методику экспрессной оценки зараженности древесины грибницей *Armillaria mellea* s.l.

Исследования выполнены частично за счет средств государственного задания на проведение фундаментальных исследований РАН (проект № 0360–2014–0006) и Программы СО РАН № II.2 «Интеграция и развитие» (проект № 0360–2015–0003).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Бурова Л. Г. Загадочный мир грибов / Под ред. М. В. Горленко. Сер. Человек и окружающая среда. М.: Наука, 1991. 96 с.
- Иванов А. И. Агариковые грибы-ксилотрофы Пензенской области // Микология и фитопатология. 1981. Т. 15. № 3. С. 192–197.
- Павлов И. Н. Биосферная роль дереворазрушающих грибов *Heterobasidion annosum* s. l. и *Armillaria mellea* s. l. (на примере кедровых лесов Западного Саяна) // Вестн. ТГУ. 2013. Т. 18. № 4. С. 1270–1273.
- Павлов И. Н., Барабанова О. А., Агеев А. А. Снижение устойчивости пихтово-кедровых лесов Восточного Саяна к корневым патогенам // ИВУЗ. Лесн. журн. 2011. № 4. С. 40–45.
- Павлов И. Н., Барабанова О. А., Кулаков С. С., Юшкова Т. Ю., Агеев А. А., Пашенова Н. В., Тарасов П. А., Шевцов В. В., Иванова Т. Н. К вопросу образования очагового куртинного усыхания сосны обыкновенной на старопахотных землях (роль корневой губки, эдафических факторов и изменения климата) // Хвойные бореальной зоны. 2010. Т. XXVII. № 3–4. С. 263–272.
- Павлов И. Н., Корхонен К., Губарев П. В., Черепнин В. Л., Барабанова О. А., Миронов А. Г., Агеев А. А. Закономерности образования очагов *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref. s. str. в географических культурах сосны обыкновенной (Минусинская котловина) // Хвойные бореальной зоны. 2008. Т. 25. № 1–2. С. 28–36.
- Селочник Н. Н. Основные болезни дуба и их влияние на состояние дубрав лесостепи // Лесохоз. инф. 1992. № 5. С. 36–37.
- Селочник Н. Н. Биологические виды рода *Armillaria* в России // II Съезд микологов России: тез. докл. Разд. 3. 2008. С. 90.
- Соколов Д. В. Корневая гниль от опенка и борьба с ней. М.: Лесн. пром-сть, 1964. 183 с.
- Стороженко В. Г., Коткова В. М. Состояние коренных ельников и дереворазрушающие грибы (Basidiomycota) заповедника «Кологривский лес» (Костромская область) // ИВУЗ. Лесн. журн. 2013. № 3. С. 17–25.
- Татаринцев А. И., Скрипальщикова Л. Н. Эколого-фитопатологическое состояние березняков на территории Красноярской группы районов // Сиб. лесн. журн. 2015. № 2. С. 8–19.
- Федоров Н. И. Корневые гнили хвойных пород. М.: Лесн. пром-сть, 1984. 160 с.
- Baumgartner K., Rizzo D. M. Distribution of *Armillaria* species in California // Mycologia. 2001. V. 93. N. 5. P. 821–830.
- Medvedeva S. E., Artemenko K. S., Krivosheenko A. A., Rusinova A. G., Rodicheva E. K., Puzyr A. P., Bondar V. S. Growth and light emission of luminous basidiomycetes cultivated on solid media and in submerged culture // Mycosphere. 2014. V. 5. N. 4. P. 565–577.
- Mihail J. D. Bioluminescence patterns among North American *Armillaria* species // Fungal Biol. 2015. V. 119. N. 6. P. 528–537.
- Schwarze F. W. M. R., Ferner D. Ansprache und Biologie holzzersetzender Pilze. Folge 8: Hallimasch-Arten // AFZ-DerWald. 2003. N. 14. S. 718–719.

WOOD LUMINESCENCE AS MARKER OF TREE *ARMILLARIA* INFECTION

A. P. Puzyr, S. E. Medvedeva

Federal Research Center Krasnoyarsk Scientific Center, Russian Academy of Sciences, Siberian Branch
Solitary Unit Institute of Biophysics Russian Academy of Sciences, Siberian Branch
Akademgorodok, 50/50, Krasnoyarsk, 660036 Russian Federation

E-mail: apuzyr@mail.ru, ccibso@mail.ru

Diagnostics of infectious diseases of trees is based on anatomical and morphological characteristics of the tree damage and determining the participants of this process. In the study of tree diseases caused by fungal pathogens their presence and description of morphological characteristics is necessary. Thus, the studies of the causes of the trees diseases are only possible for a limited amount of time, the determined period of the formation of fruiting bodies of fungi. Keep in mind that not every year the natural conditions are favorable for the basidia formation. The diagnostics of pathogen is complicated in the absence of fruiting bodies. In this case, it is required to carry out additional measures on the cultivation of fruit bodies or obtaining a pure culture of the fungal mycelium to determine the cause of the disease. According to the literature, the genus *Armillaria* fungi are the most common wood destroyers in all forest areas. In addition, they are found in the botanical gardens, parks, urban areas and on private garden plots. Unlike other fungi that destroy wood trees the mycelium complex *Armillaria mellea sensu lato* has bioluminescence. This feature allows you to identify them among other basidiomycetes growing in Russia. In this article, based on the experimental results is discussed a method for determining the infestation of trees by root pathogens complex *Armillaria mellea* s. l. by recording luminescence wood samples. It has been shown that the registration of bioluminescent signal of wood samples can be performed at any time of the year, not just during the growing season. It is supposed the possibility of identifying trees that are infected by mycelium of pathogenic fungi genus *Armillaria* in the absence of fruiting bodies. It may allow probably early detection of infected trees.

Keywords: *Armillaria* infection, mycelium bioluminescence, *Armillaria mellea sensu lato*.

How to cite: Puzyr A. P., Medvedeva S. E. Wood luminescence as marker of tree *Armillaria* infection // *Sibirskij Lesnoj Zurnal* (Siberian Journal of Forest Science). 2016. N. 6: 133–138 (in Russian with English abstract).