

УДК 635.8:632.25(477)

## ВИДОВОЕ РАЗНООБРАЗИЕ ГРИБОВ РОДА *TRICHODERMA* (PERS:FR.) ПРИ ПРОМЫШЛЕННОМ ПРОИЗВОДСТВЕ КУЛЬТИВИРУЕМЫХ ГРИБОВ В УСЛОВИЯХ УКРАИНЫ

**ЕЛЕНА МИРОНЫЧЕВА***Таврический государственный агротехнологический университет, Украина*

**Abstract.** Twenty samples of compost / substrate from Ukrainian mushroom farms contaminated by green mold have been investigated. After purification and sequencing of isolated DNA fragments, obtained results were compared with GenBank sequences. Among the fourteen samples, the following species of the genus *Trichoderma* (Pers: Fr.) were identified: *Trichoderma atroviride* P. Karst., *Hypocrea lixii* Pat., *Hypocrea sulphurea* (Schwein.) Sacc., *Hypocrea ochroleuca* B. & Rav., *Trichoderma pleuroticola*. The study found that isolated fungal pathogens *Hypocrea lixii* Pat. and *Trichoderma pleuroticola* have a close phylogenetic connection with the agents causing epidemic green mold in mushroom farms. The presence of these pathogens represents a critical issue for mushroom farms and a threat to the quality and yield of cultivated mushrooms. Therefore, for understanding the biology of these contaminants it is necessary to study their diversity as well as to establish their ecological and trophic niches in nature.

**Key words:** Edible fungi; *Agaricus bisporus*; *Pleurotus ostreatus*; Green mold, Biological contamination; Pathogenic fungi; *Trichoderma*; Species; Phylogeny

**Реферат.** Было исследовано двадцать образцов компоста и субстрата при производстве культивируемых грибов загрязненных зеленой плесенью и собранных с грибных хозяйств Украины. После очистки и секвенирования изолированных фрагментов ДНК полученные результаты сравнивали с последовательностями GenBank. Среди 14 образцов были идентифицированы следующие виды грибов рода *Trichoderma* (Pers:Fr.): *Trichoderma atroviride* P. Karst., *Hypocrea lixii* Pat., *Hypocrea sulphurea* (Schwein.) Sacc., *Hypocrea ochroleuca* B. & Rav., *Trichoderma pleuroticola*. В данном исследовании установлено, что выделенные нами грибные патогены *Hypocrea lixii* Pat. и *Trichoderma pleuroticola* филогенетически близки с возбудителями эпидемий зеленой плесени на грибных предприятиях. Наличие данных патогенов неотложная проблема грибных предприятий и угроза качеству и урожаю культивируемых грибов. Поэтому для понимания биологии данных загрязнителей необходимо изучать их видовое разнообразие *Trichoderma* (Pers:Fr.), а также устанавливать экологические и трофические ниши в природе.

**Ключевые слова:** Съедобные грибы; *Agaricus bisporus*; *Pleurotus ostreatus*; Зеленая плесень, Биологическая контаминация; Патогенные грибы; *Trichoderma*; Виды; Филогения.

### ВВЕДЕНИЕ

Грибы рода *Trichoderma* (Pers:Fr.) широко распространены и участвуют в разложении органических остатков в природе. Они присутствуют практически во всех ареалах и средах существования. Данные грибы характеризуются бесполом размножением и выделяются из почв в количестве от  $10^1$  до  $10^3$  колониобразующих единиц (КУО) на грамм (Harman, G.E. et al. 2004). Свойства этих грибов интенсивно применяются во многих отраслях народного хозяйства. Американский ученый G. Harman (4) приводит список механизмов *Trichoderma* (Pers:Fr.), который состоит из микопаразитизма, антибиоза, конкуренции за питательные вещества или пространство, толерантности к стрессу через утолщение корней и развитие растений, растворения и поглощения неорганических питательных веществ, выработанной резистентности и инактивации ферментов конкурента.

Однако в последние десятилетия грибы рода *Trichoderma* (Pers:Fr.) стали причиной серьезных эпидемий на грибных предприятиях многих стран (Kredics, L. 2010). Так называемая «зеленая плесень» *Trichoderma* (Pers:Fr.) является причиной существенных потерь урожая нескольких видов культивируемых грибов. По данным О. Шульги (2006), 86% возбудителей зеленой плесени при культивировании шиитаке в условиях Украины относятся к роду *Trichoderma* (Pers:Fr.). Эти низшие грибы принадлежат к наиболее распространенным загрязнителям культивируемых грибов как при выращивании экстенсивным способом, так и при интенсивном культивировании на твердых

растительных субстратах. Данные о распространении и видовом разнообразии зеленой плесени при интенсивном культивировании высших базидиомицетов ограничены, поэтому целью нашего исследования стало определение видового разнообразия грибов рода *Trichoderma* (Pers:Fr.) при промышленном производстве культивируемых грибов в условиях Украины.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

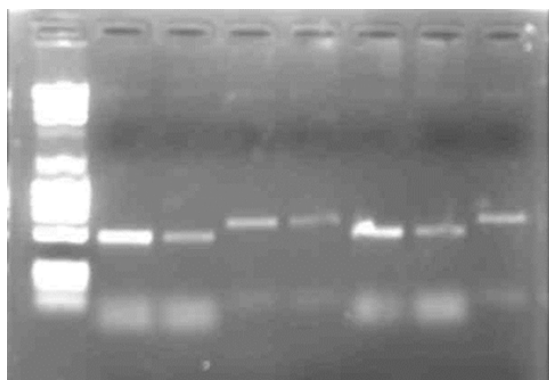
Образцы собирали в 2008 и 2011 году на грибных предприятиях Киевской, Донецкой и Запорожской областей, которые культивируют шампиньон двуспоровый *Agaricus bisporus* (J. Lge) Imbach и вешенку обыкновенную *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kumm. С пятнадцати грибных ферм было собрано двадцать образцов субстратов и компоста, зараженных зеленой плесенью. Стандартными микологическими методами (Билай, В.Т. 1982) от каждого образца были получены одиночные споровые культуры для обеспечения генетической однородности при молекулярном анализе.

Используя современные таксономические подходы (Samuels, G.J. et al. 2007) видовую принадлежность изолятов *Trichoderma* (Pers:Fr.) определяли по симптомам поражения субстратов и компоста культивируемого гриба, а также по морфологическим признакам: особенности строения мицелия, характера спороношения, размеру и форме фиалид, фиалоспор, хламидоспор, разветвления конидиеносцев, цвету колонии, ростовым параметрам. Для подтверждения данных, полученных традиционными методами, проведена идентификация всех штаммов методом полимеразно цепной реакции (ПЦР) с помощью ITS последовательностей (Lava-Sanchez, P. et al. 1972). ДНК выделяли из чистых культур грибов, выращенных на сусло-агаре, методом СТАВ (Zoller, S. et al. 1999). Внутренний транскрибируемый спейсер 1 (ITS1) участок 5,8S и внутренний транскрибируемый спейсер 2 (ITS2) рДНК были амплифицированы в лаборатории микологии университета Дюк, штат Южная Каролина, США. В работе использовались универсальные праймеры ITS25 и ITS7. После амплификации были получены видоспецифичные фрагменты длиной 600-700 п.н. Очистку и секвенирование полученных фрагментов ДНК проводили по К. О'Donnell et al. (1997).

Сравнение полученных результатов с данными GenBank sequences провели, используя поисковую систему GenBank BLAST Nucleotide на странице NCBI (Национального Центра биотехнологической информации США) BlastN 2.1.1.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенные нами исследования показали, что наиболее часто встречающимися контаминантами были виды рода *Trichoderma* (Pers:Fr.). Было выделено 14 образцов при



**Рисунок 1.** Электрофореграмма амплифицированных фрагментов ДНК образцов грибов рода *Trichoderma* (Pers:Fr.)

Примечание: в сравнении с маркером молекулярных масс от 100 до 1000 п.н., шаг 100 п.н.

культивировании шампиньона двуспорового *Agaricus bisporus* (J. Lge) Imbach и вешенки обыкновенной *Pleurotus ostreatus* (Jacq.:Fr.) Kumm. Методом ПЦР с использованием соответствующих праймеров были выделены фрагменты ДНК размером 600-700 п.н. (рисунок 1).

После очистки и секвенирования выделенных фрагментов ДНК полученные результаты сравнили с данными GenBank sequences. Среди четырнадцати проанализированных образцов были определены следующие виды грибов рода *Trichoderma* (Pers:Fr.): *Trichoderma atroviride* P. Karst., *Hypocrea lixii* Pat., *Hypocrea sulphurea* (Schwein.) Sacc., *Hypocrea ochroleuca* B. & Rav., *Trichoderma pleuroticola*.

Некоторые определенные виды не представляют серьезной угрозы культивируемым грибам. Например, *Trichoderma atroviride* P.

Karst. является обычным почвенным микроорганизмом, *Hypocrea sulphurea* (Schwein.) Sacc. и *Hypocrea ochroleuca* традиционно присутствуют на сырых остатках лиственных деревьев в окружающей среде. Однако *Hypocrea lixii* Pat. является телеоморфом *Trichoderma harzianum* Rifai, который не только используется в препаратах биологического контроля и стимуляции растений, но и способен поражать промышленную культуру шампиньона двуспорового *Agaricus bisporus* (J. Lge) Imbach. Так в 1990-х годах грибы рода *Trichoderma* (Pers:Fr) явились причиной эпидемии «зеленой плесени» в штате Пенсильвания. Этот штамм был идентифицирован как *Trichoderma harzianum* Rifai биотип 4 (Th4). В 1994-96 годах потери урожая от поражения этим штаммом составили от 30 до 100. То же самое происходило в эти годы в Ирландии, но здесь возбудителю предоставили название биотип 2 (Th2). Группа ученых M.D. Ospina-Giraldo, D.J. Royle, X. Chen и C.P. Romaine (1999) в статье о молекулярном филогенетическом анализе штаммов биологического контроля *Trichoderma harzianum* Rifai и других биотипов *Trichoderma* (Pers:Fr), ассоциированных с зеленой плесенью грибных предприятий, установила, что агрессивные биотипы 2 и 4 имеют очень тесные родственные связи со штаммами, которые используются как биоконтрольные агенты. Однако, по мнению исследователей, штаммы биоконтроля не несут ответственности за появление биотипов 2 и 4, вызвавших эпидемию, а лишь имеют общего предка.

Для ксилотрофных базидиомицетов более опасен вид *Trichoderma pleurotica*, который выделен нами при выращивании *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kumm в Запорожской области.

Международной группой ученых из Европы и Азии под руководством М. Komon-Zelazowska (2007) были проведены широкомасштабные исследования и установлен вид *Trichoderma pleurotica*, ассоциированный с предприятиями по выращиванию гриба *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kumm в Венгрии, Румынии, Италии и Южной Корее.

*Trichoderma pleurotica*, формирует отдельную ветвь наряду с такими возбудителями заболевания грибной культуры, как *Trichoderma harzianum* Rifai и *Trichoderma aggressivum* f. europaicum. Установлено, что *Trichoderma pleurotica* имеет высокой темп роста на

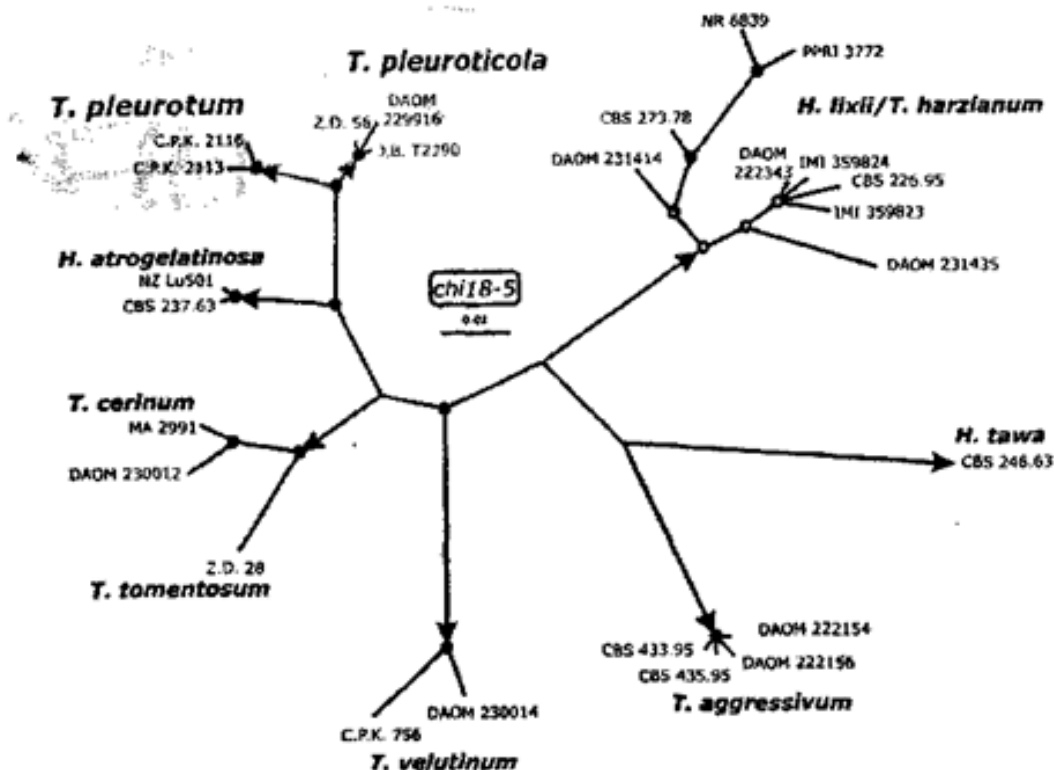


Рисунок 2. Анализ филогенетической позиции *Trichoderma pleurotica* ассоциированной с *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kumm (Komon-Zelazowska M. 2007)

легкодоступных углеводов, таких, как N-ацетил-D-глюкозамин и хинная кислота, и по способу ассимиляции этих углеводов схожа с *Trichoderma aggressivum* f. eugoraeum, возбудителем эпидемии на *Agaricus bisporus* в 90-х годах. Важно отметить, что *Trichoderma aggressivum* f. eugoraeum никогда не была найдена за пределами предприятий, тогда как *Trichoderma pleurotica* имеет множественные источники происхождения в окружающей среде и, соответственно, несет потенциальную угрозу грибным предприятиям.

## ВЫВОДЫ

Исследованием установлено, что выделенные нами грибные патогены *Hypocrea lixii* Pat. и *Trichoderma pleurotica* филогенетически близки с возбудителями эпидемий зеленой плесени на грибных предприятиях. Для эффективной борьбы с названными патогенами необходимо понимание биологии их действия, что предполагает изучение видовой разнообразия *Trichoderma* (*Pers.:Fr.*), а также установления их экологических и трофических ниш в природе.

## БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. БИЛАЙ, В.Т., 1982. Методы экспериментальной микологии. Киев: Наукова думка. 291 с.
2. ШУЛЬГА, О.В., 2006. Збудники зеленої плісені (*Trichoderma spp.*) лікарського їстівного гриба шіі-таке (*Lentinula edodes Berk.*) Pegl. та біологічне обґрунтування заходів обмеження їх розвитку: автореф. дис. ... канд. біолог. наук. Київ.
3. HARMAN, G.E., HOWELL C.R. et al., 2004. *Trichoderma* species—opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nat Rev Microbiol*, Jan. 2(1), pp. 43-56.
4. HARMAN, G.E. *Trichoderma* spp., including *T. harzianum*, *T. viride*, *T. koningii*, *T. hamatum* and other spp. Deuteromycetes, Moniliales (asexual classification system). Available from: <http://www.biocontrol.entomology.cornell.edu/pathogens/trichoderma.html>
5. KOMON-İELAZOWSKA, M., BISSET, J., ZAFARI, D. et al., 2007. Genetically closely related but phenotypically divergent *Trichoderma* species cause green mold disease in oyster mushroom farms worldwide. *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 73(22), pp. 741-742.
6. KREDICS L, JIMENEZ, Garsna, NAEIMI, S. et al., 2010. A challenge to mushroom growers: the green mould disease of cultivated champignons. In: МІНДЕЗ-ВИЛАС, А (ed.) Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology. Badajoz, no. 2, vol. 1, pp. 295-305.
7. LAVA-SANCHEZ, P.A., AMALDI, F. and LA POSTA, A., 1972. Base composition of ribosomal RNA and evolution. *J. Mol. Evol.*, nr 2, pp. 44-55.
8. O'DONNELL, K., CIGELNIK, E., WEBER, N.S and TRAPPE, J.M., 1997. Phylogenetic relationships among ascomycetous truffles and the true and false morels from 18S and 28S ribosomal DNA sequence analysis. *Mycologia*, vol. 89, pp. 48-65.
9. OSPINA-GIRALDO, M.D., ROYSE, D.J., CHEN, X. and ROMAINE, C.P., 1999. Molecular phylogenetic analyses of biological control strains of *Trichoderma harzianum* and other biotypes of *Trichoderma* spp associated with mushroom green mold. *Phytopathology*, vol. 89, pp. 308-313.
10. SAMUELS, GJ., CHAVERRI, P., FARR, D.F., & MCCRAY, E.B., 2007. *Trichoderma* Online, Systematic Botany & Mycology Laboratory, ARS, USDA. Retrieved August 3.
11. ZOLLER, S., SCHEIDEGGER, C. & SPERISEN, C., 1999. PCR primers for the amplification of mitochondrial small subunit ribosomal DNA of lichen-forming ascomycetes. *Lichenologist*, vol. 31, pp. 511-516.

Data prezentării articolului: **12.04.2013**

Data acceptării articolului: **23.05.2013**