

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ХЕРСОНСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ УНІВЕРСИТЕТ**

Факультет біології, географії і екології

Кафедра ботаніки

**КУЛЬТУРАЛЬНІ ОСОБЛИВОСТІ ЕНДОФІТІВ, ЩО АСОЦІЙОВАНІ
З ЕПІФІТНИМИ ЛИШАЙНИКАМИ**

Кваліфікаційна робота (проект)

на здобуття ступеня вищої освіти «магістр»

Виконала: студентка 217М групи

Спеціальності 091 Біологія

Освітньо-наукової програми Ботаніка

Бондаренко Анастасія Сергіївна

Керівник д.б.н., проф. Мойсієнко І.І.

Рецензент д.геогр.н., проф. Мальчикова Д.С.

Херсон – 2020

ЗМІСТ

Вступ	4
Розділ 1. Культивування грибів	8
Розділ 2. Історія культивування ліхенофільних грибів	15
Розділ 3. Матеріали та методи дослідження	19
3.1 Матеріали	19
3.2 Методи культивування грибів	20
3.3 Методи дослідження нуклеотидних послідовностей	23
Розділ 4. Характеристика культур ліхенофільних сапротрофних грибів на різних середовищах	25
4.1 <i>Alternaria</i>	25
4.2 <i>Cladosporium</i>	28
4.3 <i>Tilachlidium</i>	31
4.4 <i>Trichoderma</i>	33
РОЗДІЛ 5. Таксономічне положення окремих грибів на основі нуклеотидних послідовностей	36
5.1 Результати електрофорезу тотальної ДНК та ампліконів	36
5.2 Аналіз отриманих послідовностей за допомогою системи BLAST.....	39
Висновки	44
Список використаних джерел	46

ВСТУП

Актуальність теми. Сучасна експериментальна мікологія характеризується поєднанням класичних і нових методів дослідження організмів на клітинному, субклітинному і молекулярному рівнях. Великі можливості вивчення і регулювання процесів життєдіяльності грибів відкриває техніка культивування мікроорганізмів, що базується на сучасних біохімічних і фізико-хімічних методах дослідження грибів. На сьогоднішній час методи виділення культур мікроскопічних грибів різняться в залежності від видів грибів та особливостей їхньої життєвої стратегії.

В останні десятиліття значно зросла кількість досліджень, що присвячені вивченню видового різноманіття та фізіологічних особливостей групи сапротрофних та ендofітних грибів, а також дослідженню їх біологічної ролі, яка до сих пір залишається невивченою, особливо в контексті специфічних та більш особливих субстратів. Не менш важливим є підбір культурального середовища, адже більш специфічні субстрати (такі як лишайники) визначають специфічні умови вирощування подібних грибів в умовах культури. Не виключенням є і ліхенофільні та сапротрофні гриби родів *Alternaria*, *Cladosporium*, *Tilachlidium* та *Trichoderma*, які були виділені з різних епіфітних лишайників та є результатом кількарічних досліджень вчених кафедри ботаніки Херсонського державного університету. Оскільки лишайники розглядають як більш специфічний субстрат, то і поживні середовища повинні бути модифіковані, а для ідентифікації таких грибів мають бути використані сучасні підходи, які базуються на аналізі нуклеотидних послідовностей. Саме тому,

актуальність дослідження зумовлена визначенням найбільш оптимальних умов культивування ліхенофільних та сапротрофних грибів з метою їх подальшої ідентицікації за допомогою полімеразно-ланцюговою реакції.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дослідження проведено у рамках фундаментального наукового дослідження кафедри ботаніки ХДУ «Молекулярна філогенія, таксономія, різноманіття та охорона фіто- та ліхенобіоти Північного Причорномор'я» (номер державної реєстрації 0116U004735)

Метою даної роботи є апробація методики вирощування ліхенофільних та сапротрофних грибів в умовах культури та їх ідентифікація за допомогою полімеразно-ланцюгової реакції.

Для досягнення мети були поставлені наступні **завдання**:

- застосування методики вирощування ліхенофільних та сапротрофних грибів в умовах культури;
- визначення оптимальних поживних середовищ для росту грибних культур родів *Alternaria*, *Cladosporium*, *Tilachlidium* та *Trichoderma*;
- визначення інтенсивності росту та впливу антибіотиків на ріс культур грибів родів *Alternaria*, *Cladosporium*, *Tilachlidium* та *Trichoderma*;
- оцінити результативність виділення тотальної ДНК з грибних культур різної морфологічної будови та кольору;
- провести аналіз таксономічної приналежності досліджених культур на основі порівняння нуклеотидних послідовностей із застосування алгоритму BLAST.

Об'єктом дослідження ліхенофільні та сапротрофні представники грибів родів *Alternaria*, *Cladosporium*, *Tilachlidium* та *Trichoderma*.

Предметом дослідження є культуральні характеристики, інтенсивність росту, аналіз факторів, що впливають на ріс грибних

культур та особливості виділення тотальної ДНК досліджуваних культур.

Методи дослідження. В роботі використані методи виділення грибів в культуральні умови, методи світлової мікроскопії, анатомо-морфологічних досліджень, аналізування та статистичної обробки даних за допомогою Microsoft Excel, виділення тотальної ДНК за допомогою СТАВ-методу, проведення полімеразно-ланцюгової реакції, методи базової роботи з нуклеотидними послідовностями на основі алгоритму BLAST.

Наукова новизна одержаних результатів. В результаті проведеного дослідження було отримано та успішно підтримано життєдіяльність 20 грибних культур, які були виділені з різних лишайникових субстратів (6 культур *Alternaria*, 7 культур *Cladosporium*, 2 культури *Tilachlidium* та 5 культур *Trichoderma*). Отримано нуклеотидну послідовність регіону ITS рибосомальної ДНК представника роду *Tilachlidium*. Для 18 культур грибів успішно проведено полімеразно-ланцюгову реакцію та підготовлено матеріал для сиквенування.

Практичне значення одержаних результатів. Отримані культури є важливою частиною колекції грибних культур кафедри ботаніки Херсонського державного університету. Дослідження послугувало основою для розробки курсу «Методи культивування грибів» для СВО «Магістр». Дані доповнюють відомості про видовий склад мікобіоти Сумської та Херсонської області.

Апробація результатів дослідження. Основні положення дослідження були представлені та обговорені на засіданнях кафедри ботаніки Херсонського державного університету, а також представлено у вигляді публікації (у співавторстві) у збірнику наукових та методичних праць «Наука і методика».

Структура та обсяг роботи. Робота складається зі вступу, п'яти

розділів, висновків та списку використаних джерел. Основний зміст роботи викладений на 49 сторінці комп'ютерного тексту, містить 3 таблиці та 11 рисунків. Список використаних джерел включає 44 найменування, серед яких 31 іншомовних.

РОЗДІЛ 1

КУЛЬТИВУВАННЯ ГРИБІВ

Сучасна експериментальна мікологічна наука характеризується поєднанням класичних і нових методів дослідження організмів на клітинному, субклітинному і молекулярному рівнях.

Величезні можливості вивчення і регулювання процесів життєдіяльності грибів відкриває техніка культивування мікроорганізмів, що базується на сучасних біохімічних і фізико-хімічних методах дослідження грибів. Культивування облигатних фітопатогенних грибів (іржастих, сажкових, мучнисторосяних, тощо), зокрема, дозволило з'ясувати тонкі механізми захворювань і захисних реакцій рослини-господаря. Вивчення біосинтетичної здатності грибів, привело до виділення складних за хімічною природою та специфічних за біологічними властивостями метаболітів. Широке застосування в практиці знайшли різні ферменти грибів, що є активними відношенню до більшості відомих субстратів [5].

Залежно від цілей і методів дослідження культивування мікроскопічних грибів включає ряд етапів:

1. Підготовка зразків природних субстратів (грунту, уражених органів рослин або рослинних залишків, зерна, тощо) з яких передбачається зробити висів на звичайні (агар Чапека) і елективні (вибіркові) середовища, що забезпечують переважно розвиток одного виду або групи споріднених видів середовища.

2. Виділення і отримання чистих культур грибів на твердих поживних середовищах.

3. Пересіви чистих культур на диференційно–діагностичні середовища для подальшого визначення видової приналежності грибних колоній [4].

Культивування мікроскопічних грибів з метою накопичення біомаси або певних продуктів метаболізму передбачає:

- 1) наявність чистої культури;
- 2) підготовку стандартного посівного матеріалу;
- 3) визначення умов, необхідних для росту грибів і прояви їх біосинтетичної активності.

Методи виділення культур мікроскопічних грибів різняться в залежності від видів грибів та особливостей їхньої життєдіяльності. Виділяють кілька методів виділення культур мікроскопічних грибів: метод чистих культур, виділення фітопатогенних грибів, виділення грибів з коріння та кореневищ рослин, виділення грибів з листків та пагонів, виділення грибів з ґрунту, отримання моноспорових культур.

Гриби виділяють в чисту культуру і спостерігають за ними *in vitro*. Наявність чистих культур дає можливість визначити характер росту і спороутворення у грибів, особливості морфогенезу, виявити плодові тіла і види спороношення, встановити відношення грибів до факторів середовища (температурі, вологості, джерел світла, кислотності середовища, радіації, компонентам субстрату); визначити біосинтетичну активність продуктів метаболізму (ферментів, регуляторів росту, вітамінів) грибів; виявити ставлення грибів до фунгіцидів, лікарських препаратів; провести порівняльну характеристику ізолятів видів грибів; провести популяційні дослідження; з'ясувати взаємовідносини грибів один з одним, охарактеризувати ступінь паразитизму, спорідненість між грибами тощо [12].

Перш ніж отримати чисту культуру досліджуваного гриба, необхідно мати спори або міцелій, вільні від зараження сапротрофною мікобіотою. Одним з найбільш простих методів отримання міцелію або органів споруляції є стимулювання росту грибів і споруляції в умовах підвищеної вологості – застосування, так званих, вологих камер. Для їх виготовлення зазвичай використовують чашки Петрі. Перед закладанням об'єкта у вологу камеру його промивають у проточній воді. Вибір концентрації дезінфектанту і часу експозиції залежить від цілей дослідження і характеру досліджуваного матеріалу. Стерилізують об'єкт, використовуючи 3% перекис водню, 2% розчин марганцево-кислого калію, 70% етиловий спирт. Об'єкт витримують в розчині протягом 1–5 хв і багаторазово промивають стерильною водою [12].

Для грубих частин рослин використовують випал в полум'я. Необхідну для проведення мікологічного експерименту посуд миють з миючими засобами, загортають у папір і стерилізують в сушильній шафі протягом 2 годин при температурі 180–200° С. Інструмент стерилізують спиртом і прожарюють на вогні.

У стерильні чашки Петрі кладуть 2–3 фільтри, зволожені стерильною або проточною водою (рідше рідким живильним середовищем). Після поверхневої дезінфекції досліджуваний матеріал поміщають в чашку Петрі і ставлять в термостат при відповідній температурі (зазвичай 20–25° С). Фрагменти досліджуваних уражених об'єктів розкладають так, щоб вони не стикалися один з одним [5].

Свіжовикопані корені багаторазово промивають проточною, потім стерильною водою, віджимають в декількох шарах стерильною фільтрувального паперу, відрізками довжиною 1–3 см або цілком (у проростків) укладають на листи стерильного фільтрувального паперу в

чашках Петрі і поміщають в термостат при температурі 26° С.

Товсті корені розрізають уздовж або нарізають невеликі поперечні відрізки. Спостереження за ростом грибів та їх виділення проводять через 24–48 год та у наступні дні зростання.

Для виділення патогенних грибів з бульб, цибулин, коренеплодів і плодів необхідні попередні відмивання досліджуваного матеріалу від частинок ґрунту і поверхнева стерилізація. Зрізають стерильно невеликий шматочок на кордоні ураженої та здорової тканини і поміщають його у вологу камеру або на щільних середовищах [4].

Гриби можна виділити не тільки зі свіжого матеріалу, але і з гербарних зразків. Необхідно негайно зафіксувати гербарний матеріал висушуванням, а також охороняти від зараження сторонньої мікобіоти. Листя, стебла або їх частини поміщають в стерильний пакет з фільтрувального паперу і висушують в ньому. Після висушування листя пакет поміщають в другий пакет, також стерильний, але з більш щільного паперу. У такому вигляді зберігають до дослідження. Перед виділенням гриба матеріал поміщають у вологу камеру.

При ураженні листя або пелюсток хімічної обробки не проводять, а промивають кілька разів водою і збільшують число повторностей ураженого матеріалу.

Метод «контактного скла» (метод Росії–Холодного) – метод виділення мікроорганізмів безпосередньо з місця їх розташування в ґрунті [9]. Стерильні предметні скельця притискають до ґрунту. Через кілька днів скло струшують для звільнення від великих грудочок ґрунту і поміщають на поверхню агарового середовища, в який доданий антибіотик, стороною, стикання з ґрунтом. Грибні колонії розглядають при малому збільшенні мікроскопа і після певного періоду інкубації колонії переносять на свіже

середовище.

Метод розведення ґрунтової суспензії. Найчастіше для цих цілей застосовують розведенні 1:10 (10 г ґрунту на 100 мл води), 1: 100, 1: 1000. Суспензії з великим розведенням висівають на агар. Після появи спороношення або ознак розвитку міцелію його пересівають на щільне живильне середовище безпосередньо в пробірку на скошений агар або попередньо на агаризоване середовище, розлите в чашки Петрі. Для звільнення від бактерій, посіви досліджуваних грибів та первинне виділення культур виробляють на середовищах з рН 4,0 з додаванням в середовище для посіву антибіотиків з широким спектром антибактеріальної дії (канаміцин та ін.) в концентрації 1–2 г/л живильного середовища [18].

Облігатних паразитів вирощують на живих рослинах або спеціальних середовищах. Для подальшої роботи дуже важливо провести розчистку культури.

Розчистка здійснюється: штриховою розводкою – невелика кількість спороносного гриба знімають петлею і наносять штрихом на поверхню агару в чашки Петрі. По мірі продовження штриха спори все більше розділяються до тих пір, поки в результаті не вдаються індивідуальні колонії, що виникли з кількох або однієї спори.

У стерильній воді – готують розведення шляхом приміщення інокулюючих спор в пробірку з дистильованою водою (10 мл), потім стерильною піпеткою переносять певну кількість суспензії (наприклад, 1 мл) в пробірку з 9 мл дистильованої води. Свіжа стерильна піпетка використовується, щоб змішати рідину і перенести 1 мл в чергову пробірку, що містить 9 мл дистильованої води. Розведення продовжують в міру потреби. З останнього розведення 1 мл суспензії спор додають до розплавленого агару, охолодженого до 45° С [30].

Розведенням в середовищі – використовують п'ять пробірок з відповідним середовищем, що розплавлене та охолоджене до 45°C . Потім в одну з пробірок вносять невелику кількість спор; пробірку обертають між долонями і вміст виливають в чашку Петрі. Пусту пробірку заповнюють середовищем з іншого пробірки, обертають між долонями і виливають у другу чашку. Процедуру повторюють з іншими трьома пробірками [10].

При проведенні теоретичних досліджень або аналізі популяції будь-якої географічної форми, виявленні продуцентів. Виникає необхідність отримання культури з однієї – моноспорову культуру. Моноспорову культуру багатьох грибів отримують наступними способами:

1. Готують суспензію спор на стерильному предметному склі в дистильованій воді шляхом занурення обпаленої петлі в спорулюючу культуру. Цю суспензію спор наносять штрихом вздовж наміченої лінії в чашці Петрі на дуже тонку пластинку агаризованого середовища, яке було приготоване на кип'яченій воді, і витримують при $+ 24^{\circ}\text{C}$. Через 15–16 годин зазвичай спостерігають початок проростання і готовність для виділення.

При роботі з бінокюляром чашку Петрі переміщують уздовж лінії позначки і обирають відповідні поодинокі пророслі спори. Потім вирізують тверде поживне середовище площею близько 2×2 мм навколо спори. Цей квадрат і зону безпосередньо навколо нього перевіряють при малому збільшенні мікроскопа, щоб гарантувати наявність тільки однієї спори. Агаровий блок з пророслою спорою потім переносять за допомогою стерильної голки під бінокюляром в чашку з агаром або пробірку.

2. Живильне середовище розливають тонким шаром в стерильні чашки Петрі, потім беруть пробірку з дистильованою водою, в неї вносять невелику кількість спор досліджуваного гриба і ретельно збовтують у воді.

Після цього металевою петлею беруть 4–5 крапель спорової суспензії і переносять на предметне скло. Під мікроскопом підраховують кількість спор в кожній краплі. Якщо крапля вміщує n спор, то в пробірку додають дистильовану воду, щоб обсяг її збільшився в $n + 1$ раз [4].

При цьому можна вважати, що в одній краплі буде в середньому по одній спорі. Після цього з пробірки з розведеною суспензією спор беруть 3–4 краплі і переносять в чашки Петрі на щільних середовищах. Краплі повинні розташовуватися один від одного на порівняно великій відстані. Під мікроскопом перевіряють кількість спор, що потрапило в кожен з цих крапель. Перегляд проводять з нижньої сторони чашки, яку для цього обережно перевертають. При цьому вибирають ті краплі, в яких міститься по одній спорі і відзначають їх на склі маркером. Отримані колонії відсіваються в пробірки на щільних середовищах. Іноді краплю суспензії, що містить одну спору, поміщають на стерильне скло в чашку Петрі і додають в неї шматок агаризованого середовища; після обростання його міцелієм гриба культуру переносять в пробірку або чашку Петрі [30].

РОЗДІЛ 2

ІСТОРІЯ КУЛЬТИВУВАННЯ ЛІХЕНОФІЛЬНИХ ГРИБІВ

Близько 15000 видів грибів, що утворюють симбіоз з лишайниками описано на сьогодні. Вони складають близько 46% всіх відомих аскоміцетів, тобто однієї п'ятої всіх відомих грибів [14, 32], і, отже, є основним компонентом царства *Fungi*.

Експериментальні підходи до вивчення ліхенофільних грибів в значній мірі залежать від культивування та підтримки чистих культур цих грибів. Десятки видів були виділені на сьогоднішній день, і вони були використані в ряді досліджень по вивченню взаємодій «лишайник–паразит». Слід зазначити, що методи які використовується для ізоляції ліхенофільних грибів подібні до тих, які використовуються для мікроміцетів в цілому [31], і багато з них можуть бути введені в культуру. Проте, є групи ліхенофільних грибів, які особливо важко ввести в культуру, і важливим питанням є дослідження причин подібних труднощів.

Дослідження ліхенофільних грибів в культурі було розпочато відносно нещодавно. Але перш ніж розглянути саме ліхенофільні гриби, європейськими вченими були розроблені та використані на практиці методи вирощування грибів, що є саме компонентами лишайників – мікобіотна.

Гриби, що є компонентами лишайників активно почали досліджувати в умовах культурального середовища лише в 80-х роках ХХ століття. Це пов'язано з тим, що подібні гриби важко виділити в чисту культуру, а їх повільні темпи росту представили серйозну перешкоду на шляху фізіологічних досліджень аксенічних станів. Більшість досліджень на

окремих мікоб'єнтів були проведені з метою дослідження особливостей розвитку слані лишайників у лабораторних умовах або дослідження і подальше використання вторинних метаболітів у промисловості [31].

У результаті подібних досліджень, використання більш вдосконалених методів виділення грибів в умови чистої культури, а також їх зберігання. Було описано більш ніж 1000 видів грибів, розвиток яких так чи інакше пов'язаний з лишайниками: це були ліхенофільні гриби, що отримують поживні речовини з слані лишайників (утворюючи трьох (або навіть чотирьох) компонентні симбіотичні системи), будучи при цьому біотрофами, некротрофами або ж сапротрофами [21]. Це були лише перші етапи вивчення ліхенофільних грибів в умовах культурального середовища.

В минулому вважалось, що таксономічні дослідження ліхенофільних грибів рідко включають введення їх в культуру, хоча в роботі J. Lowen та D.L. Hawksworth (1986) згадується ряд досліджень, в яких були виділені гриби та наведені їх культуральні характеристики. Особливо корисними та цікавими є дані про Анаморфа–телеоморфа відповідність, оскільки з однієї аскоспори в культурі частіше за все утворюється конідіальна стадія гриба. Наприклад, автори отримали з однієї аскоспори ліхенофільного піреноміцета *Pronectria santessonii*. При цьому спостерігали утворення *Acremonium-like* конідій в культурах. В цих дослідженнях було показано важливе значення культивування грибів при їх дослідженні, здатність до зберігання цих грибів в колекціях культур робить їх доступними для всіх дослідників і забезпечує численні можливості для експериментальних робіт [33].

На основі обмеженої інформації, культивування ліхенофільних грибів є незвичайно складним завданням. У своїх дослідженнях P. Crittenden разом з колегами (1995) намагалися провести культивування

широкого асортименту (1183 видів) грибів, що є компонентами лишайників та ліхенофільних грибів з 20 країн світу. У результаті виявили, що ліхенофільні гриби особливо важко культивувати. Тільки 31% з них види були успішно культивовані, в порівнянні з 42% грибів, що є мікобіонтом. Автори припустили, що специфічні трофічні вимоги обмежують успішну культивування цих грибів. Проте, це дослідження показує, що багато ліхенофільних грибів, можуть бути виділені в умови чистої культури. Якщо гриби успішно ізольовані, вкрай важливо, щоб культури були розміщені в одному з декількох доступних центрів, що зберігають колекції культур, таким чином, щоб інші дослідники змогли також отримати їх [22].

Після того, як отримують культури ліхенофільних грибів, лабораторні експерименти можуть проводитися за різними напрямками. Наприклад, основні потреби в трофічному забезпеченні в значній мірі невідомі практично для всіх груп цих грибів. Стандартні грибні середовища для вирощування використовуються для підтримки росту найбільш невибагливих ліхенофільних грибів в культурі, але цілком ймовірно, що оптимальний ріст залежить від культуральних умов, які є унікальними для кожного виду або групи. Подібна інформація може бути отримана тільки шляхом ретельного лабораторного експерименту.

На сьогоднішній день культивування ліхенофільних грибів посідає важливе місце в більшості таксономічних досліджень цієї групи. Особливо важливим та перспективним напрямком постає вивчення співвідношення Анаморфи–телеоморфи, дослідження якої чітко корелюють з дослідженням грибів в умовах чистої культури [24, 25, 31, 33].

Як уже згадувалось раніше, для зберігання грибних культур існують централізовані установи, що забезпечують довгострокове та методично правильне зберігання багатьох культур грибів. З багатьох грибних колекцій

культур, доступних для депозиту, найбільш часто використовують ті що подані нижче. Перед здачею культур на зберігання слід звернутися до уповноваженої особи в обраній установі для забезпечення того, щоб були дотримані належні процедури та достатня інформація була надіслана разом з культурою [37]. Основними банками культур є:

– **ATCC – American Type Culture Collection**, 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 20110–2209 (близько 65 тис. культур);

– **CBS–Centraalbureau voor Schimmelcultures**, P.O. Box 273, 3740 AG Baarn, Netherlands (близько 100 тис. культур);

– **IMI–International Mycological Institute**, Egham, Surrey TW20 9TY, U.K. (близько 70 тис. культур);

– **NRRL–The National Center for Agricultural Utilization Research** (previously called the Northern Regional Research Laboratory), 1815 N. University Street, Peoria, IL 6160 (близько 93 тис. культур).

РОЗДІЛ 3

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

3.1 Матеріали

Матеріалами для даної роботи стали збори ліхенофільних сапротрофних грибів, що було зібрано в наступних локалітетах:

***Alternaria* spp.:** Херсонська обл.: Скадовський р-н, окол. с. Промінь, Шелеменські озера, N 46 33.757 E 32 81.855, на *Xanthoria parietina*, на *Populus*, 21.11.2015, leg. Ходосовцев О.Є., Дармостук В.В. (KHER 9328); Скадовський р-н, окол. с. Промінь, Шелеменські озера, N 46 33.757 E 32 81.855, на *Caloplaca pyracea*, на *Populus*. 05.12.2015, leg. Ходосовцев О.Є. (KHER 9432); м. Херсон, парк ім. Димітрова, на *Xanthoria parietina*, 07.01.2016, leg. Ходосовцев О.Є. (KHER);

***Cladosporium* spp.:** Херсонська обл.: Скадовський р-н, окол. с. Промінь, Шелеменські озера, N 46 33.757 E 32 81.855, на *Xanthoria parietina*, на *Populus*, 21.11.2015, leg. Ходосовцев О.Є., Дармостук В.В. (KHER 9329, 9332);

***Tilachlidium* spp.:** Сумська обл.: Середино-будський р-н, окол. с. Очкино, Національний природний парк «Деснянсько-Старогутський», на *Hypogymnia physodes*, на *Populus*, 05.08.2016, leg. Ходосовцев О.Є., Дармостук В.В. (KHER 10277);

***Trichoderma* spp.:** Херсонська обл.: Скадовський р-н, окол. с. Промінь, Шелеменські озера, N 46 33.757 E 32 81.855, на *Xanthoria parietina*, на *Populus*, 21.11.2015, leg. Ходосовцев О.Є., Дармостук В.В. (KHER 9329, 9332).

3.2 Методи культивування грибів

Культивування ліхенофільних грибів проводили на твердому поживному середовищі (агар в різних модифікаціях: PDA; MEA; SA), який готували відповідних протоколів (Табл. 3.1-3.3), в пластикових чашках Петрі діаметром 60–65 м

Таблиця 3.1

SIMPLE AGAR (на 100 мл)

Агар	2 г
H₂O	100 мл

Таблиця 3.2

POTATO DEXTROSE AGAR (на 100 мл)

20 г картоплі + 50 мл води варити на електроплитці (до стану недовареної картоплі)	
Глюкоза (в сухому вигляді)	2 г
Агар	1,5 г
H₂O	50 мл (довести до 100 мл)

Таблиця 3.3

MALT EXTRACT AGAR (на 100 мл)

Солод	3 г
*Екстракт <i>Xanthoria</i> (аналог Mycological peptone)	0,5 г
Агар	1,5 г
H₂O	100 мл

* Екстракт *Xanthoria*: 10 г сухої *Xanthoria* + 200 мл дистильованої води. Варити 30 хв. Потім профільтрувати через фільтрувальний папір або тканинний фільтр.

Перед проведенням посівів культур всі інструменти, чашки Петрі, поживне середовище потрібно простерилізувати:

- поживне середовище стерилізують в автоклаві (1 атм., 20 хв).
- зразки стерилізують під УФ 120 хв.
- інструменти (голки, леза, тощо) стерилізують під УФ-випромінюванням 20 хв або автоклавують (1 атм., 20 хв).

Леза не рекомендується стерилізувати в автоклаві або в дезинфікуючих розчинах, тому що після такої дії на них вони стають менш гострими. Безпосередньо під час роботи, голки після кожного посіву треба прогріти над спиртівкою, занурювати в спирт, потім в дистильовану воду, після цього її можна використовувати для культивування.

Поживне середовище розливають в чашки Петрі безпосередньо перед посівом. При цьому, наливають його не багато (приблизно 10 мл в кожную чашку), тільки щоб покрити все дно чашки Петрі.

Посів проводять за допомогою голки, яку до цього простерелізували, взявши субстрат і розмістивши його на поживне середовище у вигляді геометричної фігури (трикутник). Для одного посіву вистачає трьох не великих шматочків субстрату.

Після посіву, чашки Петрі закриваються кришками та закупорюються парафіном або клейкою стрічкою (скоч), та переносять їх в термостат. Для кожної чашки робиться відповідна етикетка, яка включає в себе:

- кодування об'єкта відповідно до загальної системи;
- аббревіатуру поживного середовища;
- назву гриба (її робочий варіант) скорочено;
- за умови пересіву колонії з іншої чашки Петрі, також зазначають її

кодування.

Культури інкубують у термостаті при температурі 25° С. На день культури можуть виноситись на денне світло або на УФ, для стимулювання конідіогенезу та пригнічення росту бактеріальних колоній. В цей період потрібно спостерігати за розвитком даного об'єкта, його розмірами, морфологічними особливостями та вести відповідні записи.

Коли конідії сформувались проводять їх дослідження під мікроскопом. Для цього беруть чашку Петрі звільняють її від парафіна (чи клейкої стрічки), відкривають кришку, беруть 1 см² клейкої прозорої стрічки і голкою накладають на колонію, при цьому голка повинна бути стерильна, і після цього швидко закривають чашку, для того щоб не відбувалось контамінації. На предметне скельце наносять краплю води і кладуть голкою шматок клейкої стрічки, з приклеєними конідіями. Метод дозволяє зафіксувати розміщення конідій та визначити тип конідіогенезу.

Ідентифікація виду проводилась в лабораторії біорізноманіття та екологічного моніторингу Херсонського Державного Університету. Для визначення грибів використовували тимчасові мікроскопічні зрізи лезом, які виготовляли під бінокулярним мікроскопом OPTICA ITALIA. Деталі будови плодових тіл вивчали під мікроскопом MICROMED-2. Фотографії були зроблені за допомогою кольорової камери «Levenhuk C510 NG» для мікрооб'єктів.

Для визначення субстратів ліхенофільних грибів використовувалися різні визначники [6-8, 13]. Зібрана колекція ліхенофільних грибів зберігається в ліхенологічному гербарії Херсонського Державного Університету (KHER). Назви таксонів та прізвища авторів подано за *Index Fungorum* [26].

3.3 Методи дослідження нуклеотидних послідовностей

Виділення ДНК грибів. Для виділення тотальної геномної ДНК із зразків було застосовано СТАВ-метод екстракції ДНК. Для цього шматочки матеріалу (апотеції) гомогенізували до стану пудри у епендорфах, потім додавали у кожен зразок по 500 мкл, попередньо підігрітого до 60°C 3%, СТАВ буфера, з 0,2% в-меркаптоетанолом. Проби інкубувати 60 хв. при 60°C в термостаті, додавали 600 мкл. суміші хлороформ-ізоаміловий спирт (10 хв); центрифугували 15 хв. при 13 тис. об/хв. та переносили водну фазу в чисту пробірку. До відібраного розчину добавляли 2/3 об'єму ізопропілового спирту, перемішували та залишали у морозильній камері на 2-3 години при -20°C. Далі центрифугували 25 хв. при 13 тис об/хв., осад промивали у 80% етанолі, підсушували та розчиняли у 20 мкл. TE буфера. Візуалізацію виділеної ДНК проводили шляхом електрофорезу ДНК в 1% гелі агарози. Електрофорез проводили в буфері TBE при напрузі 100 В протягом 60 хв. Після проходження електрофорезу гель фарбували 20 хв. у розчині броміду етидію (0.05 мкг/мл). В якості маркера ДНК для оцінки довжини отриманого продукту використовували DNA LadderMix 100-10000 bp. (Fermentas) [39].

Ампліфікацію здійснювали в ампліфікаторі. Умови ампліфікації: початкова денатурація: 94°C – 30 сек (5 циклів), 55 °C – 30 сек, 72°C – 1 хв; кількість циклів – 33, завершальна елонгація: 72°C – 10 хв [23].

Для ампліфікації послідовності, яка включала ITS1-5,8-ITS2 кластеру рибосомальних генів, було використано пару праймерів ITS1, ITS4, які вважаються універсальними еукаріотичними праймерами [43]. Аналіз продуктів ампліфікації проводили шляхом розділення фрагментів ДНК в 1% гелі агарози.

Очікувана довжина отриманого продукту складала 650-750 п.н. Очистку та секвенування ампліконів здійснювали на комерційній основі компанією MACROGEN (Нідерланди).

РОЗДІЛ 4

ХАРАКТЕРИСТИКА КУЛЬТУР ЛІХЕНОФІЛЬНИХ САПРОТРОФНИХ ГРИБІВ НА РІЗНИХ СЕРЕДОВИЩАХ

4.1 *Alternaria*

Alternaria Nees, Syst. Pilze (Würzburg): 72 (1816)

TYPE SPECIES: *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl.

Alternaria – це поширений рід грибів, який включає в себе сапробіотичні, ендofітні та патогенні види. Це пов'язано з широкою різноманітністю субстратів на яких зростають представники роду.

Міцелій занурений або частково поверхневих; гіфи безбарвні, оливкові коричневі. Строма утворюються рідко. Щетинки та гіфоподії відсутні. Конідієносці прості або нерегулярно та слабо розгалужені, блідо–коричневого або коричневого кольору, поодинокі або в пучках. Конідіогені клітини інтегровані. Конідіогенез політретичного або монотретичного типу. Конідії зібрані в ланцюжки або поодинокі, яйцеподібні, оберненояйцевидні, циліндричні, вузько еліпсоїдні або булавовидні, з «дзьобиком» або без нього, бліді або середнього оливково–коричневого до коричневого кольору, гладкі або шороховаті, з кількома поперечними та поздовжніми перегородками. Перегородки можуть бути товсті, темні і жорсткі, утворюючи внутрішній скелет [1-3, 20, 41, 44].

Alternaria alternata (Fr.) Keissl., Beih. bot. Zbl., Abt. 2 29: 434 (1912)

(Рис. 4.1-4.2)

Культуральні характеристики: На MEA колоні плоскі, до 40 мм за 5 днів, присутній розріджений повітряний міцелій, край щетинистий,

крайові гіфи розріджені, поверхня сіро-чорно-коричнева, реверс – темно-коричневий. На PDA колонії плоскі, до 15 мм за 5 днів, присутній рясний повітряний міцелій, край щетинистий, нерівний, крайові гіфи розріджені, поверхня сіро-чорно-коричнева, реверс – темно-коричневий.

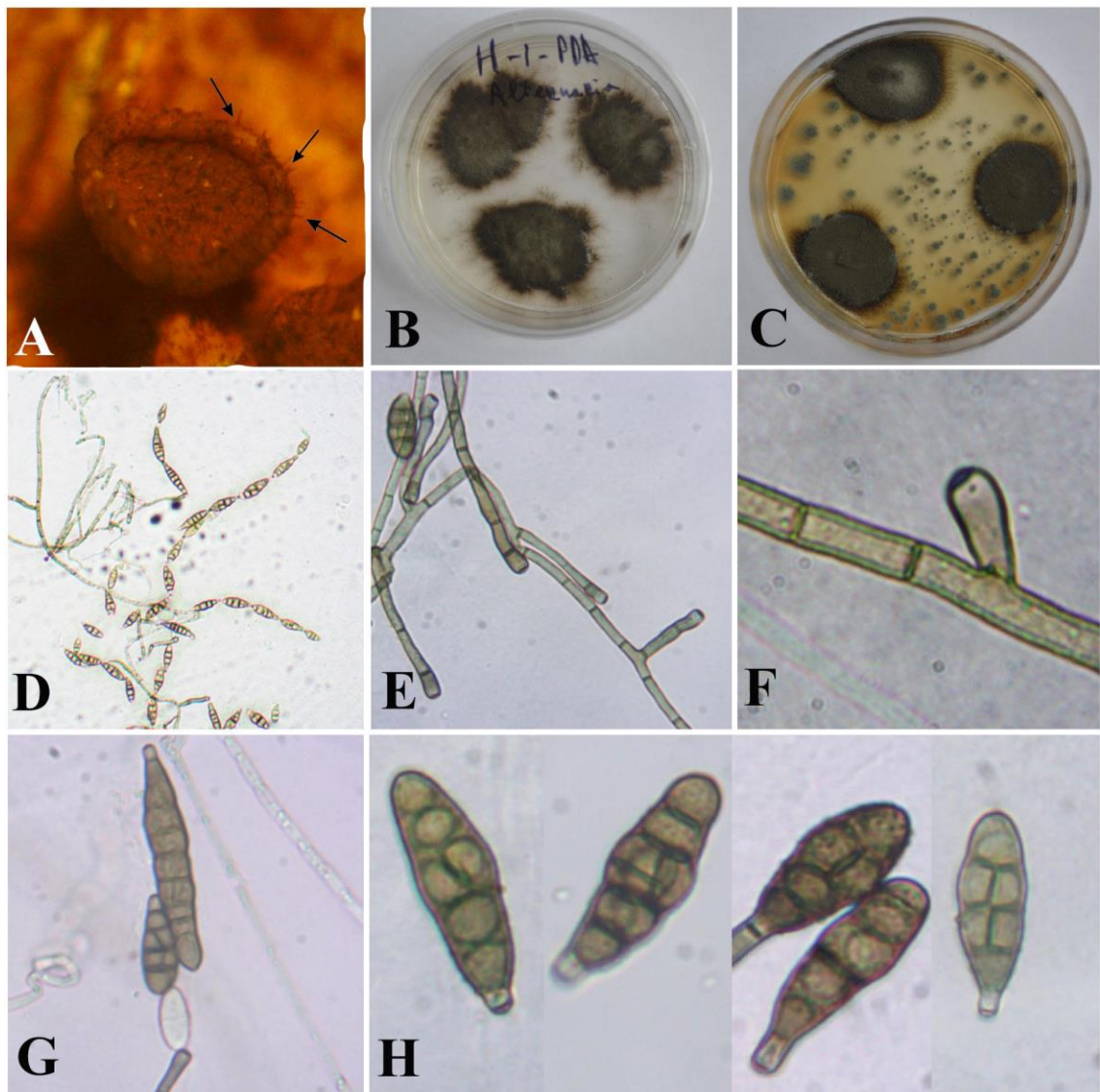


Рис. 4.1 *Alternaria alternata*: А – зовнішній вигляд уражених апотеціїв *Xanthoria parietina*; В – колонії на PDA; С – колонії на MEA; D – конідії, що зібрані в ланцюжки; Е – конідіофори; F – конідіогенна клітина; G, H – морфологічне різноманіття конідій.

Вегетативні гіфи частково поверхневі, розгалужені, септовані, гіалінові до оливкового кольору. Конідієносці утворюються як бічні вирости на вегетативних гіфах; 2–4 клітинні, блідо-оливкові до світло коричневих, 35–40 x 5–7 мкм. Конідіогенні клітини з розширеною апікальною частиною, блідо-оливкові, 10–17 x 5–7 мкм. Конідіогенез монотретичного типу. Конідії зібрані в ланцюжки по 7–11 конідій, овальні, яйцевидні до напівбулавовидних, гіалінові коли молоді, зрілі конідії від блідо-коричневого до темно-коричневого кольору, муральні, містять 2–7 поперечних септ та 1–4 повздовжні септи, 25–48 x 10–15 мкм.

Найкращий ріст колоній та інтенсивна споруляція *Alternaria alternata* спостерігається на таких поживних середовищах, як MEA, *Cetraria-agar*, *Xanthoria-agar*. Це може бути пов'язано з відносною бідністю цих середовищ, та життєвою стратегією сапротрофно-паразитичних грибів – інтенсивне захоплення території та швидка споруляція.

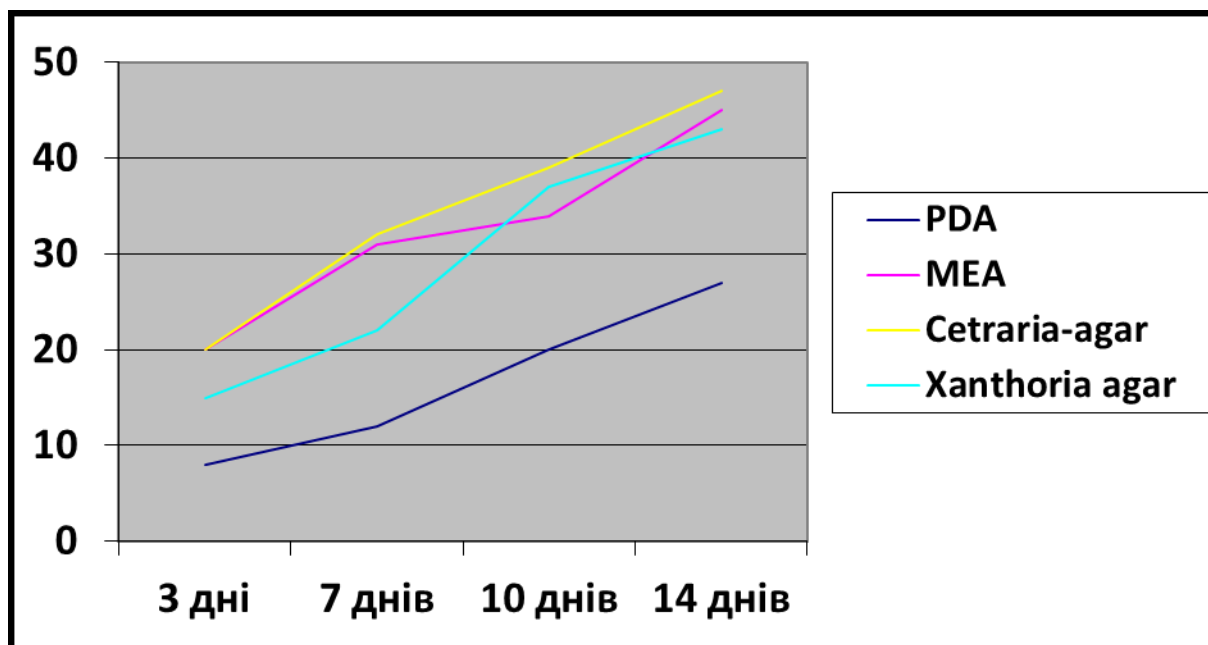


Рис. 4.2 Графік інтенсивності росту колоній *Alternaria alternata* на різних поживних середовищах.

Колонії, що зростали на PDA, мали нижчу швидкість росту, також відбувалося інтенсивне утворення повітряного міцелію, що спричинено тим, що на більш поживних середовищах (PDA в своєму складі містить продукти денатурації крохмалю та глюкозу) відбувається саме інтенсивне утворення міцелію.

Встановлено, що наявність чи відсутність в поживному середовищі антибіотиків суттєво не впливає на ріст колоній. Знаходить своє підтвердження теза про те, що для кращого росту колоній грибів потрібно використовувати екстракти, що виділені з субстрату. У даному випадку MEA, *Cetraria-agar*, *Xanthoria-agar* були виготовлені з додаванням цього екстракту та інтенсивність росту колоній в них є досить високою. В той час як колонії на PDA, який не містить в своєму складі подібних екстрактів, має низьку інтенсивність росту колоній.

4.2 *Cladosporium*

Cladosporium Link, Mag. Gesell. naturf. Freunde, Berlin 7: 37 (1816)

TYPE SPECIES: *Cladosporium herbarum* (Pers. : Fr.) Link (Clements & Shear 1931: 395).

Колонії точковидні до дедалі зростаючих, в основному оливково-коричневі до червонувато-коричневих або сіро-оливкових, колонії плоскі до більш-менш опуклих. Міцелій внутрішній або зовнішній, поверхневий; гіфи розгалужені, септовані, субгіалінові або зазвичай пігментовані, гладкі, іноді із злегка шорсткими стінками до верукозних. Строма відсутня, лише у деяких представників добре розвинена. Конідієносці поодинокі або розташовані пучком, в малих та великих пучках, як правило, прямостоячі,

іноді похилені, прямо звивисті, нерозгалужені або розгалужені, септовані, рідко субгіалінові, зазвичай чітко пігментовані, гладкі або верукозні. Конідіогені клітини інтегровані, термінальні або вставні, монобластичні або зазвичай полібластичні, в основному симподіально проліферуючі, більш-менш циліндричні, колінчато-звивисті або вузлуваті, іноді з одностороннім здуттям. Конідії поодинокі або зібрані в розгалужені або нерозгалужені ланцюги, як правило, майже кулясті, яйцеподібні, оберненояйцевидні, еліпсоїдні, веретеноподібні до циліндричних, несептовані або з декількома поперечними септами, рідше з однієї поздовжньої перегородкою, як правило субгіалінові, рідше пігментовані, гладкі або верукозні [17].

Cladosporium licheniphilum Neuchert & U. Braun, Herzogia 19: 12 (2006) (Рис. 4.3)

Культуральні характеристики: На MEA колоні плоскі, до 20 мм за 5 днів, присутній розріджений повітряний міцелій, край щетинистий, крайові гіфи щільні, короткі, поверхня сіро-зелена, реверс – чорно-зелений. На PDA колоні плоскі, до 15 мм за 5 днів, присутній розріджений повітряний міцелій, край щетинистий, крайові гіфи щільні, короткі, поверхня сіро-зелена, реверс – чорно-зелений.

Вегетативні гіфи занурені та поверхневі, розгалужені, 2–5 мкм завширшки, септовані, не звужений біля септи, гіалінові до оливково-коричневого, стерильні гіфи гладкі. Конідієносці виникають в поперечному напрямку або з висхідних гіф, поодинокі, іноді в пухких групах з двох або трьох, прямі, злегка звивисті, циліндрично-довгасті, нерозгалужені, іноді двічі розгалужені, бічні гілки, утворюються як короткий відросток трохи нижче септи, блідо-оливкового до оливково-бурого кольору, блідше до верхівки, гладкі, 14–65 × 2–3 мкм. Конідіогені клітини інтегровані,

термінальні та вставні, циліндрично-довгасті, 5–35 мкм в довжину, з 1–5 локусами 1.2–2 мкм в діаметрі, потовщені і чітко потемнілі, вторинні рамоконідії сидять на кінці конідієносців. Рамоконідії іноді формуються, усічені біля основи. Конідії численні, зчіплюються, в розгалужених ланцюгів, часто дихотомічно розгалужені, особливо в термінальній частині, конідії яйцеподібні до обернено яйцевидних.

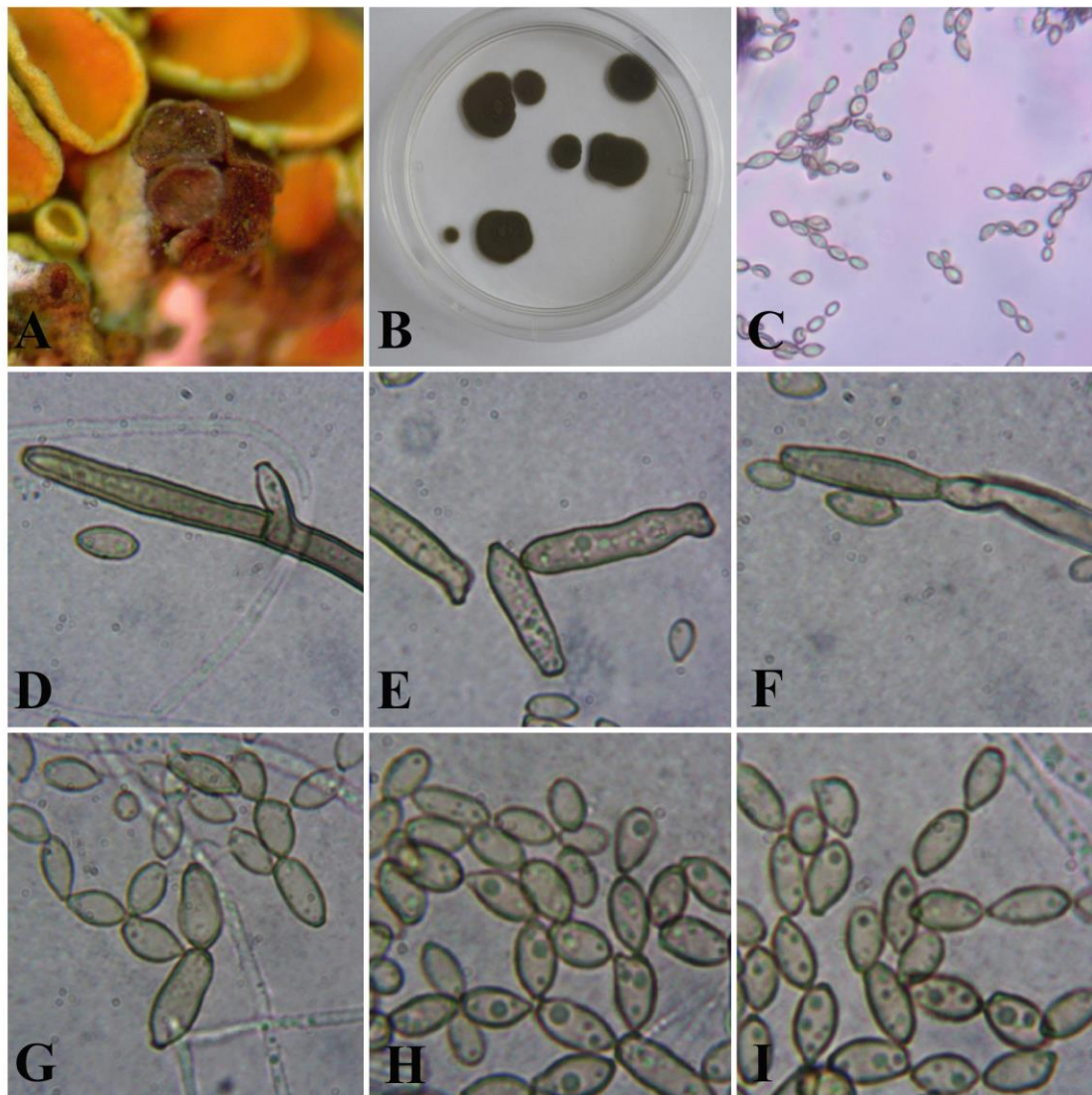


Рис. 4.3 *Cladosporium licheniphilum*: А – апотеції уражені грибом; В – колонії на PDA; С – конідії в ланцюжках; D, E, F – рамоконідії; G, H, I – конідії.

Кулясті 3–5 × 2–3 мкм, несептовані, заокруглені на верхівці, звужені до основи, гладкі, тонкостінні, інтеркалярні конідії яйцевидно-еліптичні, 5–8 (–12) × 3–4 мкм, несептовані, чітко звужені до основи.

Вторинні рамоконідії еліпсоїдні, веретеноподібні або субциліндричні, з (1) 2–3 (–4) дистальними хілами, 7–18 (–23) × (2,5–) 3–5 (–6) мкм, 0–1 (–2) – септовані, що не звужені біля септи, основа широко усічена, блідо–коричневі або світло-оливково-коричневі, гладкі.

Ріст колоній на MEA та PDA майже не відрізняється, про що свідчить майже однакові показники приросту колоній за окремі проміжки часу. Просліджується пригнічення росту в певних повторностях, що пов'язано з додаванням до складу поживного середовища антибіотику, для нівелювання контамінації грибних колоній з бактеріальними. Тобто простежується закономірність до зниження інтенсивності росту при дії антибіотику.

Колонії *Cladosporium licheniphilum* під час контамінації з іншими грибними колоніями, тотально поступається та пригнічується колоніями *Penicillium* sp.

4.3 *Tilachlidium*

Tilachlidium brachiatum (Batsch) Petch 1941 (Рис. 4.4)

Особливості росту в культурі *in vitro*. Вивчали при 25°C на денному світлі, на Difco PDA при додаванні 5 мг/л стрептоміцину.

Колонії повільно ростуть, до 1,3 см за 14 днів, блідо-рожевого кольору на верхній частині, світло-сірі на реверсі, опуклі, пухкі, з відстобурченими нечисленними конідіогенними клітинами, край колонії

Конідіофори напівмакронематозні, рідко розгалужені, гіалінові, тонкостінні, гладкостінні, септовані, інколи з олійними краплями, $(3.75-)$ $5.5 \pm 1.5 (-8.0) \times (2.5-)$ $3.5 \pm 0.5 (-5.5)$ мкм. Конідіогенні клітини дискретні, термінальні, рідше латеральні, поодинокі або зібрані в групи по 2-5 конідіогенних клітин, гіалінові, звужені до верхівки, інколи хвилясті або зігнуті, тонкостінні, фіалідні, $(16.75-)$ $20.5 \pm 2.5 (-28.0)$ мкм завдовжки, $(2.25-)$ $2.5 \pm 0.25 (-3.0)$ мкм завтовшки в нижній частині, $(0.75-)$ $1.25 \pm 0.25 (-2.0)$ мкм завтовшки у верхній частині. Конідії поодинокі, вузькоеліпсоїдні до циліндричних, закруглені біля основи та апікальної частини, одноклітинні, рідше двоклітинні, одноклітинні конідії в два рази менші ніж двоклітинні, септовані конідії з заокругленими краями, гантелевидні, сильно звужені біля септи, гладкостінні, гіалінові, інколи з невеликою кількістю олійних крапель, $(4.75-)$ $9.5 \pm 2.5 (-16.0) \times (2.0-)$ $3.25 \pm 0.5 (-4.5)$ мкм, відношення довжина/ширина складає $(2.1-)$ $3.4 \pm 0.8 (-2.2)$. Хламідоспори не спорігаються.

4.4 *Trichoderma*

Trichoderma Pers., Neues Mag. Bot. 1: 92 (1794) (Рис. 4.5-4.6)

TYPE SPECIES: *Trichoderma viride* Pers., Neues Mag. Bot

Trichoderma – дуже поширений рід, особливо в ґрунті і гниючій деревині. Інфекції викликані *Trichoderma* у людей були пов'язані головним чином з перитонеальним діалізом, трансплантацією органів і гематологічними порушеннями.

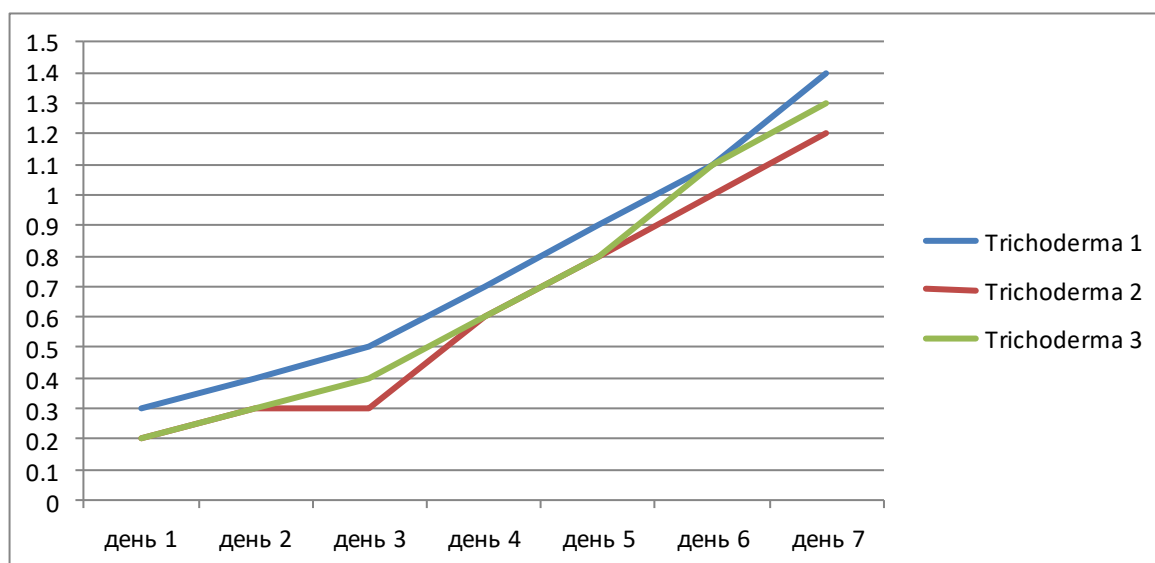


Рис. 4.5 Графік інтенсивності росту колоній *Trichoderma viride*.

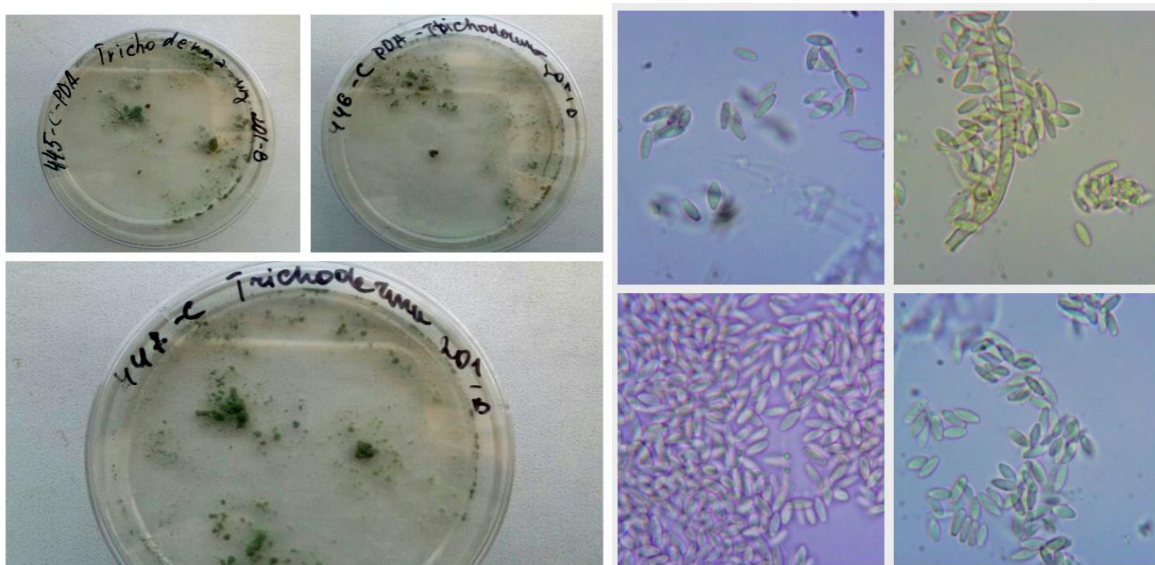


Рис. 4.6 Загальний вигляд колоній *Trichoderma viride* у культурі та конідії під мікроскопом.

Колонії швидко ростуть, спочатку білі і пухнасті, потім розвиваються жовтувато-зелені до глибоких зелених компактних пучків, часто тільки на невеликих ділянках або в концентричних кільцеподібних зонах на поверхні агару. Конідиєносці неодноразово розгалужені, іноді вертикально зігнуті.

Конідії в основному зелені, іноді гіалінові, з гладкими або шорсткими стінками і сформовані в слизових конідіальних головах (глуаспора), згруповані на кінчиках фіалідіїв [10-11, 38].

Trichoderma viride Pers., Neues Mag. Bot . 1: 92 (1794)

Культуральні характеристики: на PDA колонії плоскі, до 15 мм за 7 днів, присутній розріджений повітряний міцелій, край щетинистий, крайові гіфи щільні, короткі, поверхня – темно-зелена.

Вегетативні гіфи занурені та на поверхні розгалужені, 2-5 мкм заввишки, септований, стерильні гіфи гладкі. Конідієносці виникають у поперечному напрямку або з висхідних гіф, поодинокі, прямі, злегка звивисті, довгасті, нерозгалужені. Бічні гілки утворюються у вигляді коротких відростків, темно-зеленого чи оливково-зеленого кольорів. Конідіогенні клітини інтегровані, термінальні та вставні, циліндрично-довгасті, 5-35 мкм у довжину, з 1-5 локусами, 1,3-2 мкм у діаметрі, потовщені. Конідії численні, зчіплюються в розгалужених ланцюгах, дихотомічні, яйцеподібні або оберненояйцевидні.

РОЗДІЛ 5

ТАКСОНОМІЧНЕ ПОЛОЖЕННЯ ОКРЕМИХ ГРИБІВ НА ОСНОВІ НУКЛЕОТИДНИХ ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

5.1 Результати електрофорезу тотальної ДНК та ампліконів

Важливою умовою будь якого аналізу та правильної інтерпретації його результатів є поточний контроль якості. Полімеразно-ланцюгова реакція не є виключенням, адже підготовчий етап виділення тотальної ДНК, як і сама реакція має багатоступеневу систему контролю якості. Першою візуальною якісною реакцією при проведенні полімеразно-ланцюгової реакції можна вважати візуальну детекцію пелети ДНК. Це одна з важливих детекцій, яку дослідник спостерігає кілька разів під час виділення тотальної ДНК СТАВ-методом. Проте, варто зазначити, що подібна детекція є лише провізornoю і не може достеменно дати відповідь на питання про наявність, а тим більше про якість отриманої ДНК. Тому досить популярним методом детекції наявності ДНК в отриманих пробах вважають електрофорез в агарозному гелі [27-28].

Електрофорез в агарозному гелі в різних модифікаціях широко застосовується для поділу молекул нуклеїнових кислот, білків і інших макромолекул в біології. На водяній бані або в лабораторній печі плавлять суміш агарози, буфера і води. Потім її охолоджують до 50-60 ° С і заливають у форму. Лунки для нанесення робляться за допомогою гребінки. Досліджуваний зразок наносять в лунку за допомогою дозатора. Коли барвник, що поміщається в лунки на початку експерименту, досягає кінця гелю, електрофорез зупиняють. Потім гель забарвлюють барвником, який зв'язується з досліджуваними молекулами. Інтенсивність забарвлення

смуг барвника дає уявлення про концентрацію молекул в зразку. Крім концентрації, метод електрофорезу дозволяє визначити відносну молекулярну масу досліджуваних молекул, для цього в крайню лунку поміщають набір маркерів молекулярної маси, який повинен повністю покривати діапазон молекулярних мас досліджуваної системи.

Під час проведення нашого дослідження електрофорез проводили двічі з детекцією різних продуктів (Рис. 5.1-5.2). Зокрема, перший електрофорез проводили для визначення результатів виділення тотальної ДНК. Його характерною особливістю є наявність довгих смужок ДНК, які більш-менш рівномірно флюорисценціюють в ультрафіолетовому світлі. Це пов'язано з тим, що при виділенні тотальної ДНК відбувається фізична деструкція органел та оболонки клітин об'єкту, через що ДНК розривається на нитки різної довжини (мають різну кількість нуклеотидів) і через це різну молекулярну масу, а об'єкти з різною молекулярною масою з різною швидкістю рухаються в електричному полі.

В цілому, важливим показником якісно проведеної реакції є відсоток виходу реакції, тобто кількість зразків з позитивними результатами електрофорезу по відношенню до загальної кількості. Під час проведення наших досліджень було встановлено, що вихід реакції при візуальній детекції тотальної ДНК становить 60-75 %. Цей показник можна оцінити як достатньо високий [39-40], адже результативність СТАВ методу не є більшою ніж 80%, що пов'язано з особливостями біохімічних процесів різних представників. Зокрема, прослідковується тенденція, що виділення тотальної ДНК з грибів, які мають меланізовані структури відбувається гірше у порівнянні з гіаліновими колоніями.

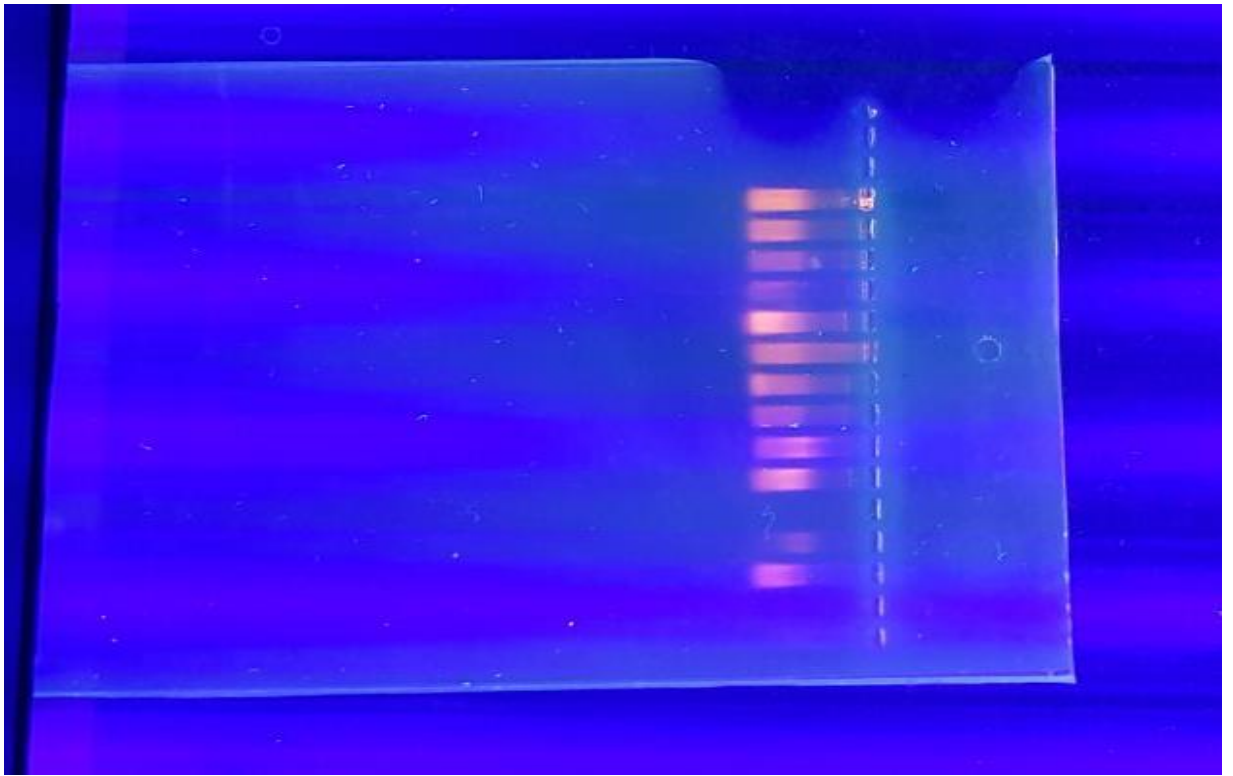


Рис. 5.1 Результати електрофорезу тотальної ДНК.

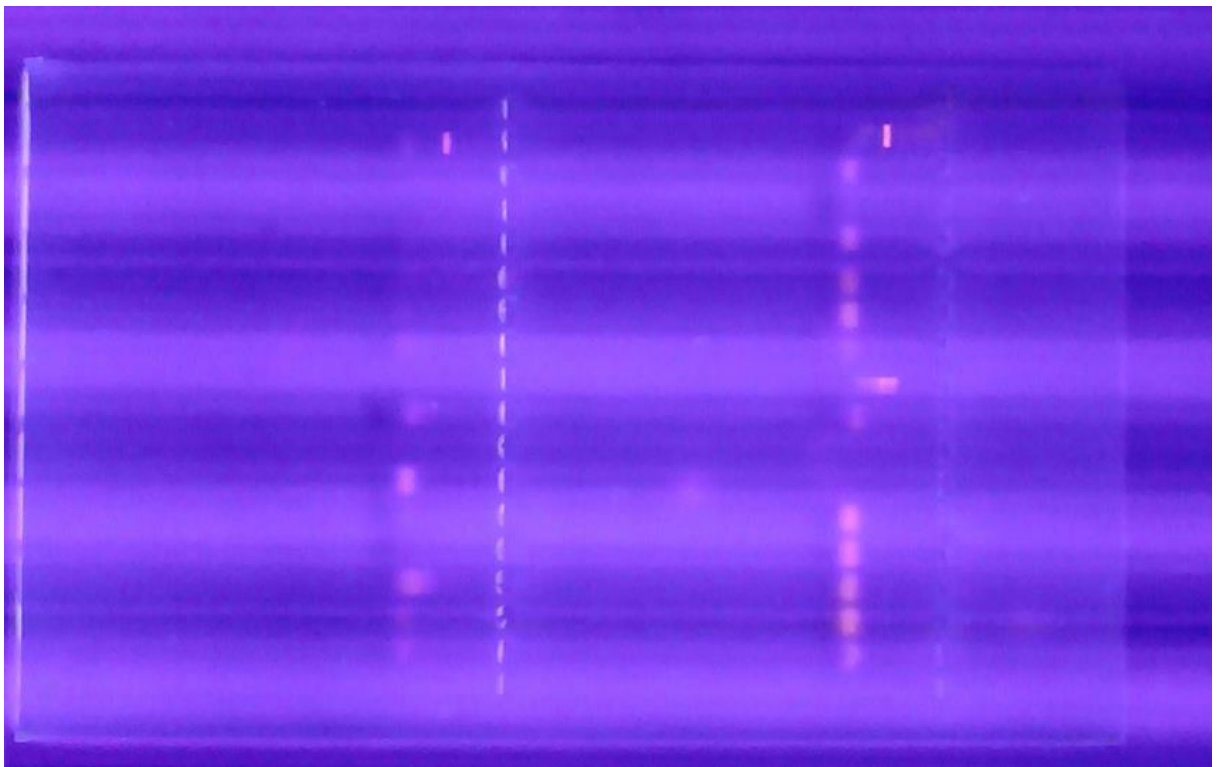


Рис. 5.2 Результати електрофорезу ампліконів.

Це може бути пов'язано з тим, що накопичення цього пігменту та його висока концентрація призводить до інгібування діючих речовин СТАВ-буферу, а від так – і до зниження продуктивності реакції. У такому випадку треба розробляти модифіковані протоколи виділення у яких кількість діючих речовин підібрана емпірично, або ж використовувати інші, більш точні методи виділення тотальної ДНК.

Другим електрофорезом, який проводять для детекції ДНК в розчині, є постаампліфікаційний. Його основне завдання – це визначити наявність ДНК в розчині, при тому вказавши на концентрацію фрагментів ДНК певної довжини (яка обмежена праймерами). Для визначення коректності проведеної полімеразно-ланцюгової реакції, в одну з лунок агарозної пластинки додають спеціальну лінійку (спеціальний розчин, який містить ДНК послідовності певного діапазону довжин). При проведенні ПЛР для ділянки ITS рибосомальної ДНК, отримані послідовності мають довжину 500-700 нуклеотидів. Результативність проведення другого електрофорезу під час проведення наших досліджень становить 80 % від загальної кількості, що можна охарактеризувати як високий результат.

5.2 Аналіз отриманих послідовностей за допомогою системи BLAST

BLAST – це програма пошуку подібності послідовностей, яка може використовуватися через веб-інтерфейс або як окремий інструмент для порівняння запитів користувача з базою даних послідовностей. Існує кілька типів BLAST для порівняння всіх комбінацій нуклеотидних або білкових запитів з базами даних нуклеотидів або білків. BLAST проводить порівняння між парами послідовностей, шукаючи області локальної подібності. Обґрунтуванням локального пошуку подібності є те, що

функціональні ділянки (наприклад, каталітичні ділянки ферментів) локалізовані на відносно короткі регіони, які є зберігаються незалежно від делецій або мутацій в проміжних частинах послідовності. Таким чином, пошук локальної подібності може дати більш біологічно значущі та чутливі результати, ніж пошук, що намагається оптимізувати вирівнювання по всій довжині послідовностей [34]. Пошук подібності послідовностей, як правило, з BLAST, є найбільш широко використовуваною і найнадійнішою стратегією для характеристики щойно визначених послідовностей. Пошуки подібності послідовностей можуть ідентифікувати "гомологічні" білки або гени шляхом виявлення надлишкової подібності між щойно визначеною послідовністю (послідовністю запитів) та будь-якою подібною послідовністю в базі даних; що, в свою чергу, відображає загальну родину. Пошуки гомологічних послідовностей є ключовим обчислювальним інструментом молекулярної біології, і вони важливі, оскільки їх продукти, високі показники оцінки, використовуються в різних областях: від оцінки еволюційних історій, до прогнозування функцій генів і білків, до виявлення рецепторів для різноманітних речовин [29, 35-36].

BLAST надає три пов'язані фрагменти інформації у вигляді необроблених балів, бітових балів та значень E, що дозволяє інтерпретувати її результати (Рис. 5.3). Невизначений бал для локального вирівнювання послідовностей – це сума балів пар максимально-важливих балів (MSP), які складають вирівнювання [15-16]. Через різницю між матрицями оцінювання, неоцінені бали не завжди прямо порівнянні. З іншого боку, бітові бали – це необроблені бали, які були перетворені з бази послідовностей матриці скорингу, яка створює вирівнювання до бази послідовностей. Це масштабування дозволяє порівнювати бітові бали між вирівнюваннями, навіть якщо були використані різні матриці оцінювання.

	Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
✓	Tilachlidium brachiatum culture MUT<ITA> 2364 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S rbo	905	905	90%	0.0	99.01%	MG813186.1
✓	Uncultured fungus clone TSPF_20 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and	566	566	92%	5e-157	86.60%	FJ213515.1
✓	Sordariomycetes sp. MAR07 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, con	547	547	82%	2e-151	88.30%	KJ882910.1
✓	Uncultured fungus clone 12 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, an	505	505	61%	1e-138	92.90%	MF142367.1
✓	Myrothecium leucotrichum strain MW2-3Sk-2-1-3 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene and internal trans	492	492	73%	9e-135	88.24%	KJ191212.1
✓	Stachybotrys bisbyi strain ZM22 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA ger	492	492	90%	9e-135	84.63%	MK102664.1
✓	Alfaria thymi CBS 447.83 ITS region, from TYPE material	492	492	73%	9e-135	88.24%	NR_154714.1
✓	Alfaria caricicola CBS 113567 ITS region, from TYPE material	492	492	73%	9e-135	88.24%	NR_154712.1
✓	Alfaria thymi strain CBS 447.83 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and inte	492	492	73%	9e-135	88.24%	KU845990.1
✓	Alfaria caricicola strain CBS 113567 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, an	492	492	73%	9e-135	88.24%	KU845983.1
✓	Achroestachys aurantispora strain CBS 187.73 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RN	492	492	92%	9e-135	84.26%	KU845803.1
✓	Myrothecium sp. 2 PV-2016 isolate DC internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed sp	492	492	73%	9e-135	88.24%	KU933731.1

Рис. 5.3 Результати пошуку послідовностей за алгоритмом BLAST.

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
905 bits(490)	0.0	502/507(99%)	3/507(0%)	Plus/Minus
Query 14	CTACCTGATTCGAGGTCA - CCTG - AAAAGTGGGGTTTCACGGCATGGCCACGCCGCTCT	71		
Sbjct 507	CTACCTGATTCGAGGTCAACTGAAAAAGTGGGGTTTCACGGCATGGCCACGCCGCTCT	448		
Query 72	CCGGTGCGAGGTGTGCTACTACGCAgggggggCTGCGGCGAGACCCCACTGAATTTCCGG	131		
Sbjct 447	CCGGTGCGAGGTGTGCTACTACGCGAGGGGAGGCTGCGGCGAGACCCCACTGAATTTCCGG	388		
Query 132	GGCCGGCCTCCGCGAGGGGGCCGATCCCCAACACCAGTCCGCCCGAAAAACGGGGGGCC	191		
Sbjct 387	GGCCGGCCTCCGCAAGGGGGGCCGATCCCCAACACCAGTCCGCCCGAAAAACGGGGGGCC	328		
Query 192	TGAGGGTTGAAATGACGCTCGAACAGGCATGCCGCCAGAATACTGGCGGGCGCAATGTG	251		
Sbjct 327	TGAGGGTTGAAATGACGCTCGAACAGGCATGCCGCCAGAATACTGGCGGGCGCAATGTG	268		
Query 252	CGTTCAAAGATTGATGATTCACATGAATTCGCAATTCACATTACTTATCGCATTTTCGCT	311		
Sbjct 267	CGTTCAAAGATTGATGATTCACATGAATTCGCAATTCACATTACTTATCGCATTTTCGCT	208		
Query 312	GCGTTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTGATTCGTTTTT-	370		
Sbjct 207	GCGTTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTGATTCGTTTTT	148		
Query 371	GCATTAAGCCACTCAGATATTCACATGTAATAACAGAGGTTAAGGTCCTCCGGCGACACC	430		
Sbjct 147	GCATTAAGCCACTCAGATATTCACATGTAATAACAGAGGTTAAGGTCCTCCGGCGACACC	88		
Query 431	TCCCGGAGAGGGAGATGGCTCGCCGAAGCAACAAAAGGTATGTTACAAAAGTTGGAGAT	490		
Sbjct 87	TCCCGGAGAGGGAGATGGCTCGCCGAAGCAACAAAAGGTATGTTACAAAAGTTGGAGAT	28		
Query 491	TTAAAAATCTGTAATGATCCCTCCGCA 517			
Sbjct 27	TTAAAAATCTGTAATGATCCCTCCGCA 1			

Рис. 5.4 Матриця вирівнювання досліджуваної послідовності з послідовністю MG813186.1.

Під час проведення наших досліджень, для ідентифікації культури ліхенофільного *Acremonium* подібного ліхенофільного гриба було використано метапошук в базі даних генетичного різноманіття GENBANK

з використанням інтегрованого алгоритму пошуку BLAST (Рис. 5.4). В результаті аналізування було виявлено, що досліджувана послідовність є на 99,01 % ідентичною до послідовності MG813186.1 (Рис. 5.5), яка депонована під назвою «*Tilachlidium brachiatum* culture MUT:2364 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence», який було ізольовано з атлантичних губок [19]. Подібний показник ідентичності вважається високим на видовому рівні і вказує на те, що обидві послідовності належать до одного і того ж самого виду. Незначна різниця між ними може бути пояснена генетичною мінливістю організмів, проте ця різниця є досить незначною, щоб вказувати на приналежність цих двох організмів до різних видів.

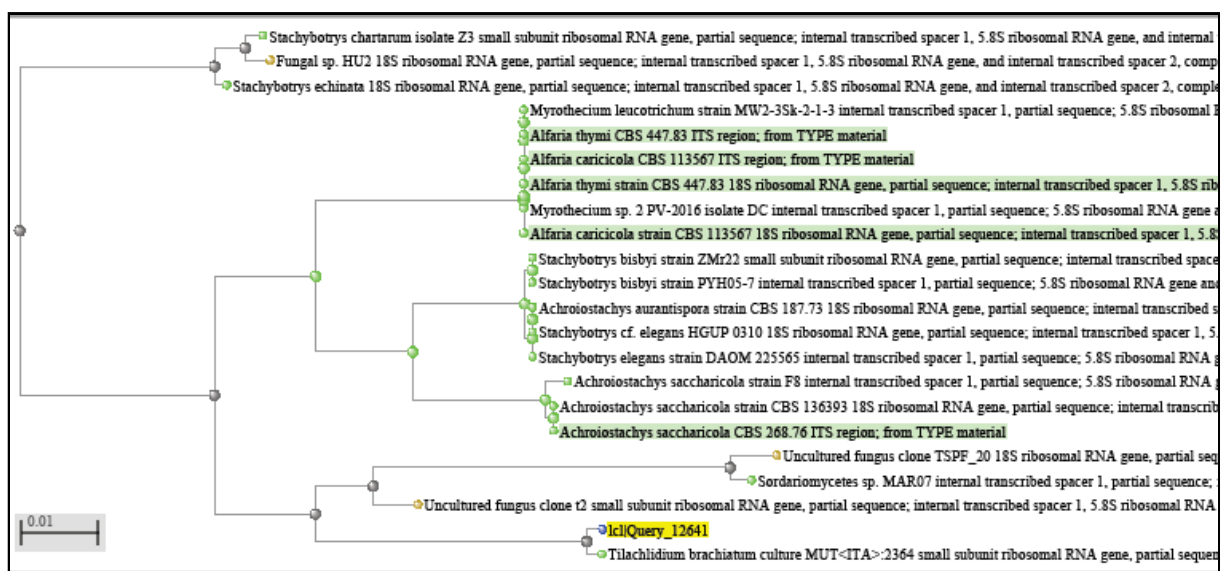


Рис. 5.5 Дендрограма, що побудована на основі пошуку за алгоритмом BLAST.

Рисунок 5.5 показує результати кластеризації виявлених послідовностей і відповідно філогенетичне дерево, що побудоване на їх основі. Як можна побачити з рисунку, досліджувана послідовність чітко співвідноситься з вищезазначеною послідовністю. Також, разом з кількома неідентифікованими представниками сордарієвих грибів вони формують окрему кладу, гілки якої мають високий рівень статистичної підтримки. Разом, з тим отримане філогенетичне дерево дає нам чітке уявлення про видову належність цього виду та його місце серед подібних таксонів і його інтерпретація як *Tilachlidium brachiatum* не викликає сумніву.

В цілому, *Tilachlidium brachiatum* – це факультативний фітопатогенний гриб, який є досить поширеним на території Європи. Його характерні морфологічні особливості в природних умовах не були зафіксовані, тому першою робочою гіпотезою було те, що це новий для науки представник роду *Acremonium*. Саме тому, аналіз нуклеотидних послідовностей регіону ITS рибосомальної ДНК представляє собою один з універсальних методів ідентифікації морфологічно близьких груп видів.

ВИСНОВКИ

1. У результаті дослідження апробована методика вирощування ліхенофільних та сапротрофних гіфоміцетів з родів *Alternaria*, *Cladosporium*, *Tilachlidium* та *Trichoderma*. У результаті дослідження було створено 20 грибних культур, які були виділені з різних лишайникових субстратів (6 культур *Alternaria*, 7 культур *Cladosporium*, 2 культури *Tilachlidium* та 5 культур *Trichoderma*). Ці культури є важливою частиною колекції грибних культур кафедри ботаніки ХДУ.

2. При ідентицікації досліджених представників встановлено, що на слані *Xanthoria perietina* зростає *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl., що є поширеним сапротрофним видом, *Cladosporium licheniphilum* Heuchert & U. Braun та *Tilachlidium brachiatum* (Batsch) Petch виявились новим для території України.

3. Ріст колоній на картопляно-декстрозному та солодовому агарях майже не відрізняється, про що свідчить майже однакові показники приросту колоній за окремі проміжки часу.

4. Просліджується пригнічення росту колоній *Cladosporium* в певних повторностях, що пов'язано з додаванням до складу поживного середовища антибіотику, для нівелювання контамінації грибних колоній з бактеріальними. У той час у інших колоніях факультативно ліхенофільних грибів такої тенденції не було виявлено.

5. Встановлено, що результативність виділення тотальної ДНК СТАВ-методом з грибних культур має результативність близько 80 %. Це може бути пов'язано з тим, що виділення ДНК меланізованих колоній нижче у порівнянні з гіаліновими.

5. Проведено полімеразно-ланцюгову реакцію деяких з отриманих культур, що дозволило встановити таксономічну приналежність *Tilachlidium brachiatum* за допомогою метапошуку в базі даних генетичного різноманіття GENBANK з використанням інтегрованого алгоритму пошуку BLAST. Для інших 18 культур також було успішно проведено ПЛР та підготовлено матеріали для розшифровки послідовностей в компанії Macrogen. Встановлено, що аналіз нуклеотидних послідовностей регіону ITS рибосомальної ДНК представляє собою один з універсальних методів ідентифікації морфологічно близьких груп видів.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Ганнибал Ф.Б. Виды рода *Alternaria* в семенах зерновых культур / Ф.Б. Ганнибал // Микология и фитопатология. – 2008. – 42(4). – С. 359–368.
2. Курченко І.М. Целюлазна і ксиланазна активності фітопатогенних та ендofітних штамів грибів *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler / І.М. Курченко, О.В. Соколова, Н.М. Жданова, А.М. Яринчин, О.М. Йовенко // Мікробіол. журн. – 2008. – 70(4). – С. 25–30.
3. Курченко И.Н. Ростовые характеристики эндofитных и фитопатогенных штаммов *Alternaria alternata* і *Ceratocystis* sp. / И.Н. Курченко, А.К. Павличенко, Е.М. Юрьева // Мікробіологія і біотехнологія. – 2013. – (2). – Р. 77–85.
4. Литвинов М.А. Методы изучения почвенных микроскопических грибов / М.А. Литвинов. – Л. : Наука, 1969. – 124 с.
5. Методы экспериментальной микологии / И.А. Дудка, С.П. Вассер, И.А. Элланская – Киев : Наукова думка, 1982. – 552 с.
6. Окснер А. М. Флора лишайників України / А. М. Окснер. – К. : Наукова думка, 2010. – Т.2, вип. 3. – 613 с.
7. Окснер А. М. Флора лишайників України / А. М. Окснер. – К.: Вид-во АН УРСР, 1968. – Т.2. вип. 1. – 500 с.
8. Определитель лишайников СССР. Вып. 2. Морфология, систематика и географическое распространение / А. Н. Окснер. – Л. : Наука, 1974. – 284 с.
9. Перт С. Дж. Основы культивирования микроорганизмов и клеток / С. Дж. Перт. – М. : Мир, 1978. – 331 с.

10. Рудаков О. Л. Микофильные грибы, их биология и практическое значение / О.Л. Рудаков. – М. : Наука, 1981. – 160 с.
11. Сейкетов Г. Ш. Грибы рода *Trichoderma* и их использование в практике / Г. Ш. Сейкетов – Алма-Ата : Наука, 1982. – 248 с.
12. Семенов С. М. Лабораторные среды для актиномицетов и грибов: Справочник / С. М. Семенов. – М.: Агропромиздат, 1990. – 240 с.
13. Ходосовцев О. Є. Лишайники причорноморських степів України / О. Є. Ходосовцев. – К. : Фітосоціоцентр, 1999. – 236 с.
14. Ainsworth G. C. Ainsworth & Bisby's dictionary of the fungi / G. C. Ainsworth. – Cabi, 2008. – 700 p.
15. Altschul S. F. Issues in searching molecular sequence databases / S. F. Altschul, M. S. Boguski, W. Gish, J. C. Wootton // Nature Genetics. – 1994. – 6. – P. 119–129.
16. Altschul S. F. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs / S. F. Altschul, T. L. Madden, A. A. Schaffer, J. Zhang // Nucleic Acids Research. – 1997. – 25. – P. 3389–3402.
17. Bensch K. The genus *Cladosporium* / K. Bensch, U. Braun, J. Z. Groenewald, P. W. Crous // Studies in Mycology. – 2012. – 72. – P. 1–401.
18. Bomar M. T., Knöpfel S. A. 1992. A method for the estimation of the culturing quality of dehydrated mycological media / M. T. Bomar, S. A. Knöpfel // International journal of food science and technology. – 1992. – 27(5). – P. 589–592.
19. Bovio E. The culturable mycobiota associated with three Atlantic sponges, including two new species: *Thelebolus balaustiformis* and *T. spongiae* / E. Bovio, L. Garzoli, A. Poli, V. P. Prigione, D. A. Firsova // Fungal Syst. Evol. – 2018. – 1(1). – P. 141–167.
20. Chou H. H., Wu W. S. Phylogenetic analysis of internal transcribed

spacer regions of the genus *Alternaria*, and the significance of filament-beaked conidia / H.H. Chou, W.S. Wu // *Mycological Research*. – 2002. – 106. – P. 164–169.

21. Cole G.T. *Biology of conidial fungi* / G.T. Cole. – Elsevier, 2012. – 460 p.

22. Crittenden P. D. Attempted isolation and success in the culturing of a broad spectrum of lichen-forming and lichenicolous fungi / P.D. Crittenden, J. C. David, D. L. Hawksworth, F. S. Campbell // *New phytologist*. – 1995. – 130(2). – P. 267–297.

23. Doyle J. J., Doyle J.L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue / J. J. Doyle, J.L. Doyle // *Focus*. – 1990. – 12. – P. 13–15.

24. Hawksworth D. L. Secondary fungi in lichen symbioses: parasites, saprophytes and parasymbionts / D. L. Hawksworth // *Journal of the Hattori Botanical Laboratory*. – 1982. – 52. – P. 357–366.

25. Heuchert B., Braun U. On some dematiaceous lichenicolous hyphomycetes / B. Heuchert, U. Braun // *Herzogia*. – 2006. – 19. – P. 11–21.

26. Index Fungorum. Режим доступа: <http://www.indexfungorum.org/names/names.asp>

27. Kerfeld C. A., Scott K. M. 2011. Using BLAST to teach “E-value-tionary” Concepts / C. A. Kerfeld, K. M. Scott // *PLoS Biology*. – 2011. – 9(2). – P. e1001014.

28. Klein J. R., Gulsvig T. Using bioinformatics to develop and test hypotheses: *E. coli*-specific virulence determinants / J. R. Klein, T. Gulsvig // *Journal of Microbiology & Biology Education*. – 2012. – 13(2). – P. 161–169.

29. Korf I. Serial BLAST searching / I. Korf // *Bioinformatics*. – 2003. – 19(12). – P. 1492–1496.

30. Kusari S. Chemical ecology of endophytic fungi: origins of

secondary metabolites / S. Kusari, C. Hertweck, M. Spiteller // *Chemistry & Biology*. – 2012. – 19(7). – P. 792–798.

31. Lawrey J. D. Isolation and culture of lichenicolous fungi / J. D. Lawrey // in: *Protocols in Lichenology*. – Springer Berlin Heidelberg, 2002. – P. 75–84.

32. Lawrey J. D., Diederich P. Lichenicolous fungi: interactions, evolution, and biodiversity / J. D. Lawrey, P. Diederich // *The Bryologist*. – 2003. – 106(1). – P. 80–120.

33. Lowen R., Hawksworth D.L. *Nectriella santessonii*, a new lichenicolous pyrenomycete with an *Acremonium* anamorph / R. Lowen, D. L. Hawksworth // *Lichenologist*. – 1986. – 18. – P. 321–328.

34. Neumann R. S., Kumar S., Shalchian-Tabrizi K. BLAST output visualization in the new sequencing era / R. S. Neumann, S. Kumar, K. Shalchian-Tabrizi // *Briefings in Bioinformatics*. – 2014. – 15(4). – P. 484–503

35. Newell P. D. A Small-Group Activity Introducing the Use and Interpretation of BLAST / P. D. Newell, A. D. Fricker, C. A. Roco, P. Chandransu, S. M. Merkel // *Journal of Microbiology & Biology Education*. – 2013. – 14(2). – P. 238–243.

36. Parra G. Comparative Gene Prediction in Human and Mouse / G. Parra, P. Agarwal, J. F. Abril, T. Wiehe, J. W. Fickett, R. Guigo // *Genome Research*. – 2003. – 13. – P. 108–117.

37. Petrini O., Hake U., Dreyfuss M. M. An analysis of fungal communities isolated from fruticose lichens / O. Petrini, U. Hake, M. M. Dreyfuss // *Mycologia*. – 1990. – 82. – P. 444–451.

38. Rifai M. A. A revision of the genus *Trichoderma* / M. A. Rifai // *Mycol. Pap.* – 1969. – 116. – P. 1–56.

39. Tarieiev A. S. Modified method of DNA extraction from herbarium

specimens / A. S. Tarieiev, A. I. Girin, N. I. Karpenko, O. V. Tyshchenko, I. Yu. Kostikov // *Chornomors'k. bot. z.* – 2011. – 7(4). – P. 309–317.

40. Tavaré S. Some probabilistic and statistical problems in the analysis of DNA sequences / S. Tavaré // *Lectures on mathematics in the life science.* – 1986. – 17. – P. 57–86.

41. Thomma B. P. *Alternaria* spp.: from general saprophyte to specific parasite / B. P. Thomma // *Molecular Plant Pathology.* – 2003. – 4(4). – P. 225–236.

42. Vobis G. Studies on the germination of lichen conidia / G. Vobis // *Lichenologist.* – 1977. – 9. – P. 131–136.

43. White T. J., Bruns T., Lee S., Taylor J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis M., Gelfand D., Sninsky J., White T. J. *PCR protocols: a guide to methods and applications.* Academic Press, San Diego, CA, 1990, pp. 315–322.

44. Woudenberg J. H. C. *Alternaria* redefined / J. H. C. Woudenberg, J. Z. Groenewald, M. Binder, P. W. Crous // *Studies in Mycology.* – 2013. – 75. –