



## WYKORZYSTANIE REGIONU IGS FRAGMENTU DNA W TECHNICIE PCR-RFLP DO IDENTYFIKACJI GRZYBÓW RODZAJU *ARMILLARIA*

Agata Rutkowska

Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

**Streszczenie.** Opieńkowa zgnilizna korzeni jest jedną z najniebezpieczniejszych chorób korzeniowych w Polsce występującą w drzewostanach zarówno iglastych, jak i liściastych. Największe straty ekonomiczne w drzewostanie iglastym powoduje *Armillaria ostoyae*, natomiast za najgroźniejszy gatunek opieńki porażający drzewostany dębowe uważa się opieńkę żółtotrzonową (*A. gallica*). Celem pracy było określenie zróżnicowania gatunkowego rodzaju *Armillaria* zasiedlającego wybrane drzewostany dębowe na terenie leśnictwa Górzyska (Nadleśnictwo Smolarz, RDLP Szczecin) za pomocą powszechnie stosowanych w dziedzinie biologii molekularnej metod łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR) i polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych (RFLP). Materiał badawczy stanowiły ryzomorfy zebrane z gleby oraz szyi korzeniowej 74 dębów charakteryzujących się zróżnicowanym ubytkiem aparatu asymilacyjnego. Analiza regionu IGS rDNA w technice PCR-RFLP pozwoliła stwierdzić, że dominującym gatunkiem opieńki na badanym obszarze była *Armillaria gallica*.

**Słowa kluczowe:** ryzomorfy, opieńka żółtotrzonowa (*Armillaria gallica*), łańcuchowa reakcja polimerazy (PCR), polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych (RFLP), region IGS

### WSTĘP

Grzyby rodzaju *Armillaria* należą do jednych z najbardziej pospolitych na świecie. Wywołują jedną z najgroźniejszych chorób korzeni, będącą przyczyną wielu strat gospodarczych w leśnictwie – opieńkową zgniliznę korzeni. Dotychczas opisano ponad 40 gatunków z tego rodzaju (Żółciak, 2005). W Polsce stwierdzono występowanie sześciu gatunków opieńki (Łakomy, 2001; Mańka, 2005): *Armillaria borealis* Marxmüller

---

Corresponding author – Adres do korespondencji: Mgr inż. Agata Rutkowska, Katedra Ekonomiki Leśnictwa, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, ul. Wojska Polskiego 71 C, 60-625 Poznań, e-mail: agata.rutkowska@up.poznan.pl

& Korhonen, *A. cepistipes* Valenovsky, *A. ostoyae* (Romagnesi) Herink, *A. mellea* (Vahl.) P. Kummer, *A. gallica* Marxmüller & Romagnesi oraz *A. tabescens* (Scop.) Emel. Największe straty gospodarcze w drzewostanach iglastych powoduje *A. ostoyae*, natomiast w drzewostanach liściastych – *A. gallica*, będąca patogenem słabości, zasiedlającym drzewa poddane działaniu czynników stresowych (związanych najczęściej z obniżeniem poziomu wód gruntowych). Tym samym gatunek ten jest jednym z czynników biotycznych, współuczestniczących w zamieraniu drzewostanów dębowych.

Rodzaj *Armillaria* można identyfikować za pomocą klasycznej metody bazującej na morfologicznych cechach owocników, a także z użyciem testu zgodności genetycznej grzybni (intersterylności) opracowanego przez dr. Kari Korhonen (1978). Oba sposoby są jednak czasochłonne, a w przypadku pierwszej łatwo o błędy w analizie taksonomicznej, dlatego w ostatnich latach coraz częściej wykorzystuje się technikę identyfikacji grzybów z użyciem genetyki molekularnej. Stosując metodę PCR-RFLP, możliwa jest amplifikacja danego fragmentu DNA, a następnie trawienie cząsteczki przez specyficzne enzymy restrykcyjne, co umożliwia dokładne rozróżnienie gatunków w bardzo krótkim czasie.

W 1998 roku zespół badawczy prof. dr. hab. Ryszarda Siweckiego podjął badania w Nadleśnictwie Smolarz pod kątem ulepszenia uprawy i ochrony drzewostanów dębowych. Opieńką zajmował się wówczas prof. dr. hab. Piotr Łakomy (Łakomy i Siwecki, 2000), który za pomocą testu zgodności genetycznej grzybni wykazał powszechne występowanie *A. gallica* na badanym obszarze. Z kolei Potyrska i in. (2002) próbowali zidentyfikować izolaty opieńki poprzez analizę informacji zawartej w sekwencji nukleotydowej fragmentu ITS (ang. *internal transcribed spacer*). Wyniki tej pracy okazały się jednak niejednoznaczne.

Po piętnastu latach postanowiono przystąpić do kolejnego zdiagnozowania opieńki w wytypowanych wcześniej drzewostanach dębowych. Bazując na dotychczasowych badaniach, założono, że *A. gallica* nadal będzie gatunkiem dominującym, a trafność tej tezy potwierdzi identyfikacja rodzaju *Armillaria* metodą PCR-RFLP. Analizie zostanie jednak poddany inny fragment DNA – region IGS (ang. *intergenic spacer region*), proponowany przez wielu autorów.

## MATERIAŁ I METODYKA BADAŃ

Badaniami zostały objęte trzy oddziały znajdujące się w zasięgu administracyjnym leśnictwa Górzyska (obwód Smolarz) – 438a, 450a oraz 466a. Charakterystykę wybranych drzewostanów przedstawiono w tabeli 1.

Na podstawie wielkości ubytku aparatu asymilacyjnego (tab. 2) wytypowano w oddziałach 438a i 450a po 10 drzew z każdego stopnia defoliacji (łącznie 30 drzew/oddział), natomiast w oddziale 466a – 15 drzew (po 5 z każdego wariantu). Dęby wybrano w taki sposób, aby były stosunkowo równomiernie rozmieszczone w przestrzeni.

Materiał badawczy stanowiły ryzomorfy (sznury grzybniove) zebrane z gleby oraz szyi korzeniowej 74 drzew (w przypadku jednego z wytypowanych dębów w oddziale

Tabela 1. Cechy taksacyjne drzewostanów  
Table 1. Forest stand characteristics

Wydzielenie Forest stand	Powierzchnia Area ha	Udział Dbb w drzewostanie Sessile oak contribution to the tree stand	Wiek w 2013 roku Age in 2013	Pierśnica Diameter at breast height cm	TSL Forest site type	Gleba Soil	Gospodarstwo Forest holding
438a	6,00	9	116	37	LMśw	RDbr	O
450a	27,59	8	155	48	Lśw	RDbr	S – WDN
466a	16,66	9	166	52	Lśw	BRwy	S – WDN

Tabela 2. Stopnie defoliacji drzew na podstawie przyjętego procentowego ubytku aparatu asymilacyjnego  
Table 2. Defoliation degree on the basis of losses in the assimilation apparatus

Stopień defoliacji Defolia- tion degree	Objaśnienie Explanation	Procentowy ubytek aparatu asymilacyjnego Percentage loss in the assi- milatation apparatus
I	drzewa zdrowe lub z niewielkim ubytkiem aparatu asymilacyjnego healthy trees or with a small loss in the assimilation apparatus	0–20
II	drzewa ze średnim ubytkiem aparatu asymilacyjnego trees with an average loss in the assimilation apparatus	21–65
III	drzewa z silnym ubytkiem aparatu asymilacyjnego lub zmarłe trees with a great loss in the assimilation apparatus or dead	>66

466a nie wykazano obecności ryzomorf). W tym celu każde pojedyncze drzewo zostało dokładnie odsłonięte przy szyi korzeniowej na głębokość 20 cm. Pobrane w odległości 30 cm od pnia wszystkie ryzomorfy (zarówno przetrwalnikowe, jak i infekcyjne) zebrano do papierowych kopert, które po opisaniu przewieziono do laboratorium.

W kolejnym etapie przystąpiono do przygotowania materiału badawczego do izolacji DNA. Sznury grzybniove dokładnie opłukano w silnym strumieniu bieżącej wody w celu oczyszczenia z ziemi i drobnych korzeni, a następnie podzielono na dwie części w proporcji 1:4. Mniejszą część zdezynfekowano w 70-procentowym alkoholu etylowym, mieszając przez 2 min. Kolejno płukano każdorazowo 2 × po 5 min w 100 ml autoklawowanej wody, po czym suszono przez 1 h w sterylnej bibule filtracyjnej. W warunkach jałowych wycinano krótkie fragmenty ze środka wysterylizowanej ryzomorfy, następnie umieszczano je w próbkach typu Eppendorf, które opisywano numerem powierzchni oraz drzewa, po czym zamrażano. Następnie każdą próbę rozcierano w porcelanowym moździerz laboratoryjnym zamrożonym w temperaturze –70°C. Tak przygotowany materiał wkładano do opisanych próbek zawierających kuleczki cyrkonowe i przechowywano w zamrażarce.

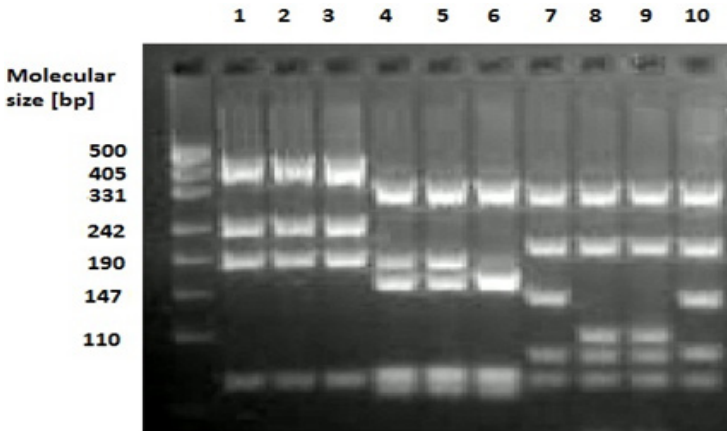
Izolację DNA przeprowadzono za pomocą gotowego zestawu Bead-Beat Micro Gravity (A&A BIOTECHNOLOGY, Gdynia), według wskazówek producenta: roztartą próbkę zawieszono w 1 ml buforu LSU oraz 20  $\mu$ l proteiny K, po czym inkubowano w urządzeniu Thermomixer w temperaturze 50°C przy parametrach ciągłego mieszania 1400 rpm przez 1 h. W międzyczasie przygotowano kolumny Micro AXD do oczyszczania DNA, na które naniesiono po 500  $\mu$ l roztworu równoważącego K1. Po odwirowaniu inkubowanych próbek (5 min przy 12 000 rpm) pobrano z każdej klarowny supernatant i umieszczono na zrównoważoną uprzednio kolumnę. Następnie dodawano kolejno 600  $\mu$ l roztworu płuczającego W1G, 500  $\mu$ l roztworu płuczającego W2 oraz 60  $\mu$ l roztworu elucyjnego E, po uprzednim odczekaniu całkowitego przejścia roztworu przez kolumnę. Ostatnim etapem ekstrakcji DNA było przeniesienie kolumny do jałowej próbki typu Eppendorf o pojemności 1,5 ml i eluowanie DNA przez naniesienie na złożę kolumny 120  $\mu$ l roztworu elucyjnego E. Dopiero tak przygotowane oczyszczone DNA mogło zostać poddane działaniu techniki PCR-RFLP.

W celu identyfikacji gatunków *Armillaria* zamplifikowano metodą PCR region IGS (ang. *intergenic spacer region*) fragmentu DNA z wykorzystaniem starterów CNL 12 oraz 5SA. Do reakcji amplifikacji wykorzystano gotową mieszaninę 2 $\times$ PCR mix (A&A BIOTECHNOLOGY, Gdynia), którą stanowiły: 0,1 U/ $\mu$ l Taq DNA polimeraza, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM dNTPs (trójfosforany deoksyrybonukleotydów), czerwony barwnik oraz bufor obciążający. Amplifikację przeprowadzono w termocyklerze TPersonal firmy Biometra. Sprawdzenie produktu PCR (5  $\mu$ l) wykonano za pomocą elektroforezy w 1-procentowym żelu agarozowym (0,7 g agarozy, 70 ml buforu 1 $\times$ TBE, 4  $\mu$ l bromku etydyny) przy napięciu 120V przez 20 min. Jako marker wielkości wykorzystano Dramix (A&A BIOTECHNOLOGY, Gdynia).

Następnie uzyskany produkt PCR został poddany trawieniu enzymami restrykcyjnymi (endonukleazami) metodą RFLP. Wykorzystano enzymy: *AluI*, *TaqI* oraz *BsmI*, które rozpoznają specyficzne dla siebie sekwencje z amplifikowanym fragmentem DNA i przecinają cząsteczkę w charakterystycznym miejscu. Metodykę identyfikacji *Armillaria* sp. opracowano na podstawie dostępnej literatury (Harrington i Wingfield, 1995; Keča i in., 2006). Dodatkowo w celu porównania otrzymanych wzorów prążkowych wykorzystano DNA wzorców, które wcześniej zidentyfikowano za pomocą testu intersterylności (rys. 1).

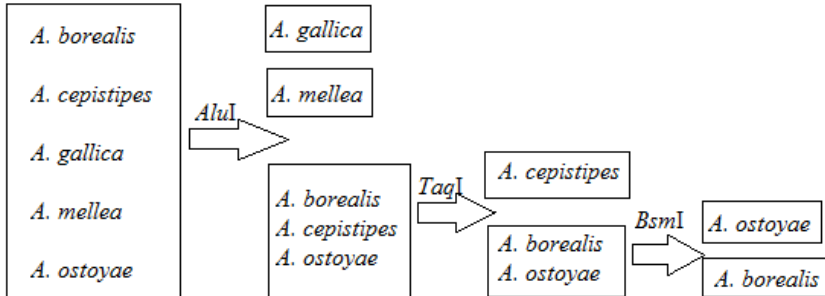
W pierwszej kolejności wszystkie próby trawiono enzymem *AluI*, który różnicuje *A. gallica* oraz *A. mellea* od pozostałych gatunków. Gatunki *A. borealis*, *A. cepistipes* oraz *A. ostoyae* w wyniku trawienia tym enzymem mogą charakteryzować się jednym wzorem prążkowym, dlatego do ich pełnej identyfikacji wykorzystano *TaqI* oraz *BsmI*. Enzym *TaqI* wyodrębni wyraźnie wzór prążkowy charakterystyczny dla *A. cepistipes*, natomiast *BsmI* wyróżnia *A. ostoyae* od pozostałych gatunków (rys. 2).

Sprawdzenie produktu trawienia (5  $\mu$ l) wykonano za pomocą elektroforezy w 3-procentowym żelu agarozowym (1% agarozy klasycznej, 2% agarozy restrykcyjnej, 280 ml buforu 1 $\times$ TBE, 12  $\mu$ l bromku etydyny) przy napięciu 90V przez 3 h. Jako marker wielkości wykorzystano Dramix (A&A BIOTECHNOLOGY, Gdynia). Uwidocznione podczas elektroforezy prążki oglądano na transiluminatorze UV i fotografowano.



Rys. 1. Wzór prążkowy dla wzorców gatunków *Armillaria* – trawienie enzymem *AluI*: 1–3 – *A. gallica*, 4–6 – *A. mellea*, 7 – *A. ostoyae*, 8–9 – *A. borealis*, 10 – *A. cepistipes*

Fig. 1. RFLP pattern for *Armillaria* sp. – *AluI* enzyme digestion: 1–3 – *A. gallica*, 4–6 – *A. mellea*, 7 – *A. ostoyae*, 8–9 – *A. borealis*, 10 – *A. cepistipes*

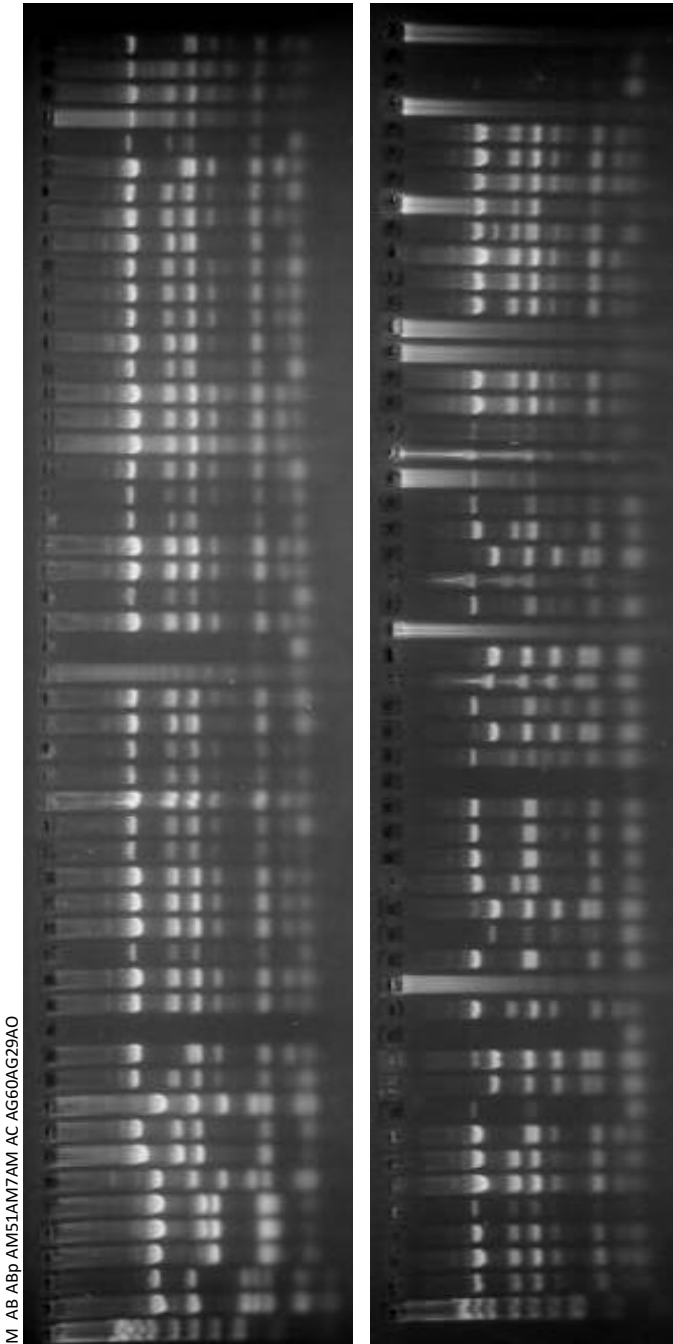


Rys. 2. Schemat identyfikacji gatunków rodzaju *Armillaria* z wykorzystaniem enzymów restrykcyjnych

Fig. 2. Diagram of identifying species of *Armillaria* with the use of restriction enzymes

## WYNIKI

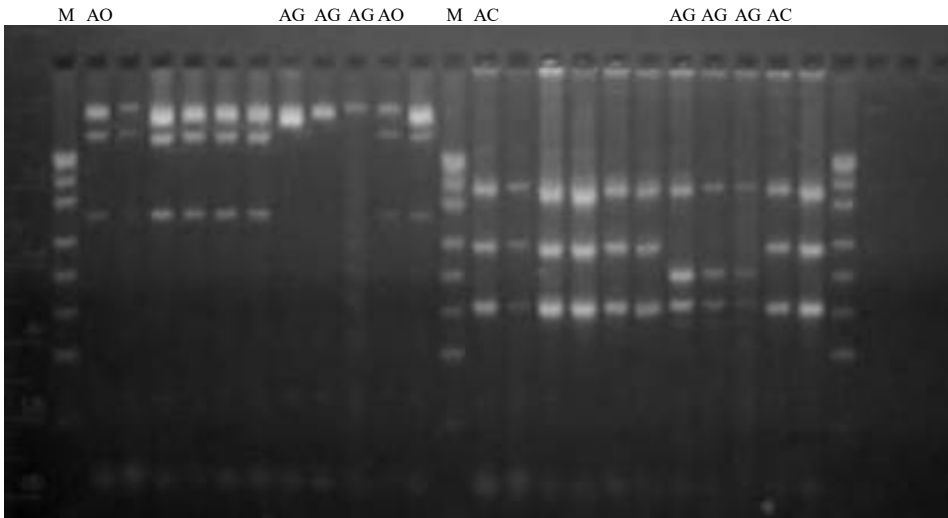
Na podstawie przeprowadzonego trawienia enzymem restrykcyjnym *AluI*, a następnie porównania otrzymanych wzorów prążkowych ze wzorcami i wzorami prążkowymi dostępnymi w literaturze (Keča i in., 2006) sklasyfikowano łącznie 60 prób należących do gatunku *Armillaria gallica* (rys. 3). Trawienie enzymem *BsmI* wykazało cztery próby



Rys. 3. Wynik trawienia enzymem restrykcyjnym *AluI*. Pierwszy prażek (M) stanowi marker Dramix, kolejne – wzorce: AB, ABp – *Armillaria borealis*; AM51, AM7, AM – *A. mellea*; AC – *A. cepistipes*; AG60, AG29 – *A. gallica*; AO – *A. ostoyae*. Następne prażki odpowiadają badanym próbom

Fig. 3. Digestion result of *AluI* restriction enzyme. First lane (M) composes Dramix marker, another ones – RFLP patterns: AB, ABp – *Armillaria borealis*; AM51, AM7, AM – *A. mellea*; AC – *A. cepistipes*; AG60, AG29 – *A. gallica*; AO – *A. ostoyae*. Next lanes correspond with examined samples

należące do *A. ostoyae*, natomiast enzym *TaqI* wyróżnił 10 prób o wzorze prążkowym odpowiednim dla *A. cepistipes* (rys. 4). W celu przejrzystego porównania wzorów prążkowych, odpowiednich dla sklasyfikowanych gatunków, dodano po trzy próby należące do *A. gallica*. Ewentualne wyniki negatywne lub fałszywie pozytywne, widoczne jako próby bez wzoru prążkowego, powtarzano, łącznie z etapem przygotowania DNA.



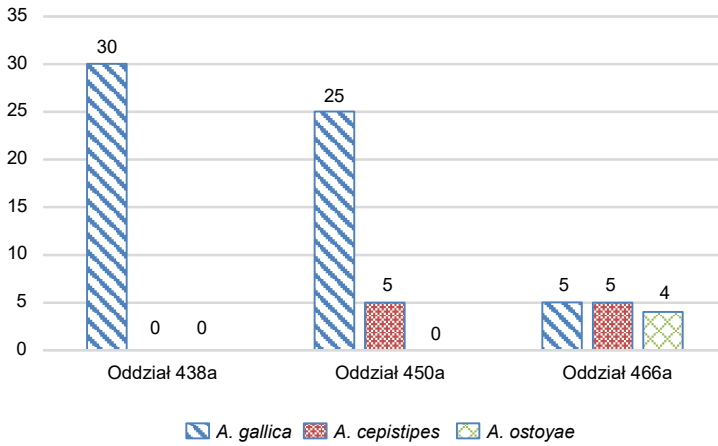
Rys. 4. Wynik trawienia enzymem *BsmI* i *TaqI*. Pierwszy prążek (M) stanowi marker Dramix, kolejne AO – *A. ostoyae* wyróżniona enzymem *BsmI* – oraz AC (*A. cepistipes*) wyróżniona enzymem *TaqI*; AG – *A. gallica*

Fig. 4. Digestion result of *BsmI* and *TaqI* restriction enzyme. First lane (M) composes Dramix marker, another AO – *A. ostoyae* highlighted by *BsmI* enzyme and AC (*A. cepistipes*) highlighted by *TaqI* enzyme; AG – *A. gallica*

Dzięki wykonanej identyfikacji gatunków grzybów rodzaju *Armillaria* za pomocą metody PCR-RFLP okazało się, że wszystkie próby pobrane z oddziału 438a należą do opieńki żółtotrzonowej (*Armillaria gallica*). Gatunek ten dominował również na powierzchni wyłączanego drzewostanu nasiennego w oddziale 450a, gdzie współwystępował razem z *A. cepistipes*. Największym zróżnicowaniem opieniek charakteryzował się drzewostan w oddziale 466a, w którym wyróżniono *A. gallica*, *A. cepistipes* oraz *A. ostoyae* (rys. 5).

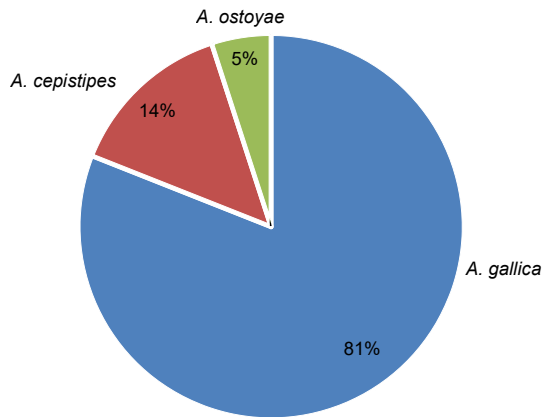
Spośród 74 prób pobranych w trzech drzewostanach dębowych Nadleśnictwa Smolarz dominującym gatunkiem opieńki okazała się *Armillaria gallica* (81% prób). Niewielki udział stanowiły *A. cepistipes* (14%) oraz *A. ostoyae* (5%) (rys. 6).

Nie wykazano obecności innych gatunków opieniek występujących w Polsce.



Rys. 5. Liczba drzew zainfekowanych przez dany gatunek rodzaju *Armillaria* w wybranych drzewostanach dębowych Nadleśnictwa Smolarz

Fig. 5. Amount of infected trees by a given *Armillaria* sp. in chosen oak stands in Smolarz Forest District



Rys. 6. Udział gatunków rodzaju *Armillaria* w wybranych drzewostanach dębowych Nadleśnictwa Smolarz

Fig. 6. Percentage of *Armillaria* sp. in chosen oak stands in the Smolarz Forest District



## DYSKUSJA

*Armillaria gallica* jest uważana powszechnie za patogena słabości, atakującego głównie drzewostany dębowe poddane czynnikom stresowym. Twierdzenie to przywołuje wielu autorów (Łakomy, 2001 za Rishbeth, 1982; Łakomy i Siwecki, 2000 za Davidson i Rishbeth, 1988; Marçais i Caël, 2006; Szewczyk i Łakomy, 2011 za Guillaumin i Lung, 1985), wskazując tym samym na obecność opieńki żółtotrzonowej w procesie zamierania drzewostanów dębowych.

W Nadleśnictwie Smolarz został udokumentowany problem cyklicznie powtarzających się okresów suszy (począwszy od 1983 roku), które spowodowały znaczne obniżenie poziomu wód gruntowych (Siwecki, 1999). Wymieniony czynnik, połączony z założeniem drzewostanu dębowego na powierzchni podsadzonej wcześniej świerkiem, doprowadził do uaktywnienia chorób grzybowych. Konsekwencje zaistniałej sytuacji można było zaobserwować chociażby w latach 1991–1996, kiedy to zamieranie dębu stwierdzono w nadleśnictwie na łącznej powierzchni 1400 ha (Siwecki, 1999).

*Armillaria gallica* występowała bardzo licznie na każdej powierzchni badawczej – spośród wszystkich badanych izolatów opieńka żółtotrzonowa stanowiła aż 81%, natomiast opieńka maczugowata 14%, a opieńka ciemna 5%. Podobne wyniki uzyskali Łakomy i Siwecki (2000), którzy badając piętnaście lat wcześniej dokładnie te same oddziały wykazali występowanie *A. gallica* w 90%, natomiast *A. cepistipes* – 3% i *A. ostoyae* – 7%.

Zastosowanie techniki PCR-RFLP pozwoliło na szybką i bardzo dokładną identyfikację gatunków grzybów rodzaju *Armillaria* występujących w badanych oddziałach na terenie leśnictwa Górzyska. Należy jednak pamiętać, że bardzo ważny jest wybór fragmentu DNA, który zostanie poddany działaniu enzymów restrykcyjnych. Badania Potyralskiej i in. (2002) nad regionem ITS okazały się nieskuteczne – *A. borealis*, *A. cepistipes*, *A. gallica* i *A. ostoyae* były do siebie zbyt podobne i ujawniły wysoką zmienność wewnątrzgatunkową. Wobec tego należy zgodzić się z tezą Harringtona i Wingfielda (1995), że tylko trawienie DNA w regionie IGS za pomocą enzymu restrykcyjnego *AluI* stanowi wiarygodne postępowanie dla jednoznacznej identyfikacji *A. gallica*, natomiast wyróżnienie *A. cepistipes* i *A. ostoyae* można uzyskać poprzez trawienie regionu IGS enzymami *TaqI* oraz *BsmI*, czego dowodem są również wyniki badań niniejszej pracy.

## WNIOSKI

1. Najbardziej powszechnym gatunkiem opieńki w badanych drzewostanach dębowych była opieńka żółtotrzonowa (*A. gallica*).

2. Region IGS fragmentu DNA poddany działaniu PCR-RFLP pozwala na szybką i bardzo dokładną identyfikację gatunków grzybów rodzaju *Armillaria*.

## PIŚMIENNICTWO

- Bead-Beat Micro Gravity – protokół izolacji DNA (b.d.). Gdynia: A&A Biotechnology.
- Davidson, A. J., Rishbeth, J. (1988). Effect of suppression and felling on infection of oak and Scots pine by *Armillaria*. *Eur. J. For. Pathol.*, 18, 161–186.
- Guillaumin J. J., Lung B. (1985). Etude de la spécialisation d'*Armillaria mellea* (Vahl.) Kumm. et *Armillaria obscura* (Schaeff.) Herink en phase saprophytique et en phase parasitaire. *Eur. J. For. Pathol.*, 15, 342–349.
- Harrington, T. C., Wingfield, B. D. (1995). A PCR-based identification method for species of *Armillaria*. *Mycologia*, 87(2), 280–288.
- Keča, N., Bodles, W. J. A., Woodward, S., Karadžić, D., Bojović, S. (2006). Molecular-based identification and phylogeny of *Armillaria* species from Serbia and Montenegro. *Forest Pathol.*, 36, 41–57.
- Korhonen, K. (1978). Infertility and clonal size in the *Armillariella mellea* complex. *Karstenia*, 18, 31–42.
- Łakomy, P. (1998). Monitoring huby korzeni i opieńkowej zgnilizny korzeni w wybranych uprawach sosnowych Krainy Wielkopolsko-Pomorskiej. *Rocz. AR Pozn., Rozpr. Nauk.* 283.
- Łakomy, P., Siwecki, R. (2000). Gatunki z rodzaju *Armillaria* występujące w Nadleśnictwie Smolarz. *Sylwan*, 4, 115–121.
- Łakomy, P. (2001). The first record of *Armillaria mellea* sensu stricto in a forest ecosystem in Poland. *Phytopathol. Pol.*, 21, 151–163.
- Mańka, K. (2005). *Fitopatologia leśna*. Warszawa: PWRiL.
- Marçais, B., Caël, O. (2006). Spatial pattern of the density of *Armillaria* epiphytic rhizomorphs on tree collar in oak stand. *Forest Pathol.*, 36, 32–40.
- Potyrska, A., Schmidt, O., Moreth, U., Łakomy, P., Siwecki, R. (2002). rDNA-ITS sequence of *Armillaria* species and a specific primer for *A. mellea*. *Forest Genet.*, 9(2), 119–123.
- Rishbeth, J. (1982). Species of *Armillaria* in southern England. *Plant Pathol.*, 31, 9–17.
- Siwecki, R. (1999). Sprawozdanie „Ulepszenie uprawy i ochrona drzewostanów dębowych (*Quercus petraea* Liebl.) w Nadleśnictwie Smolarz (RDLP Szczecin)”. Kórnik.
- Szewczyk, W., Łakomy, P. (2011). The occurrence of *Armillaria* species in Siemianice experimental Forest District. *Acta Sci. Pol., Silv. Colendar. Rat. Ind. Lignar.*, 10(1), 5–10.
- Żółciak, A. (2005). *Opieńki* (s. 18–19). Warszawa: CILP.

## USE OF IGS REGION OF THE RIBOSOMAL DNA IN THE PCR-RFLP TECHNIQUE TO IDENTIFY MUSHROOMS OF *ARMILLARIA*

**Abstract.** *Armillaria* root rot is one of the most dangerous diseases of tree root systems in Poland, occurring both in coniferous and deciduous stands. The greatest economic losses in coniferous stands cause *Armillaria ostoyae*, on the other hand *Armillaria gallica* is considered to be the most important species infecting deciduous stands. The aim of the research was to define diversity of *Armillaria* species settling the chosen oak stands in the Górzyska Forest Range (Smolarz Forest District, Szczecin Regional Directorate of State Forests) by means of commonly used, in the molecular biology area, polymerase chain reaction (PCR)

and restricted fragment length polymorphism (RFLP) techniques. Rhizomorphs were collected from soil and the root collar of 74 oaks characterized by differential loss in assimilation apparatus. The analysis of IGS region of the ribosomal DNA in the PCR-RFLP technique allows to claim that dominant *Armillaria* species on the study area was *Armillaria gallica*.

**Key words:** rhizomorphs, *Armillaria gallica*, polymerase chain reaction (PCR), restricted fragment length polymorphism (RFLP), intergenic spacer region (IGS)

Received – Przyjęto: 30.11.2015      Accepted for print – Zaakceptowano do druku: 14.12.2015

For citation – Do cytowania: Rutkowska, A. (2015). Wykorzystanie regionu IGS fragmentu DNA w technice PCR-RFLP do identyfikacji grzybów rodzaju *Armillaria*. Acta Sci. Pol. Silv. Colendar. Rat. Ind. Lignar., 14(4), 335–345. DOI: 10.17306/J.AFW.2015.4.28