

Ю.А. Марковская, мл. науч. сотрудник; О.Ю. Баранов, ст. науч. сотрудник; М.Я. Острикова, аспирант ИЛ НАН Беларуси

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ПАСПОРТИЗАЦИЯ ШТАММОВ ЛЕСНЫХ БАЗИДИОМИЦЕТОВ

The thirteen different strain's of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) from collection of Forest Institute NAS of Belarus have been the subject of the current molecular genetics analysis.

В производстве съедобных базидиомицетов особый интерес представляют грибы вешенка обыкновенная (*Pleurotus ostreatus* (Fr.) Kumm) и шиитаке (*Lentinus edodes* (Berk.) Sing.), вследствие чего в разных странах мира активно ведутся исследования этих видов. Вместе с тем, несмотря на значительные успехи, достигнутые в вопросах технологии культивирования съедобных грибов [1], остаются проблемы, связанные с разработкой точных методов идентификации различных штаммов и изучение генетических различий между ними.

Целью настоящего исследования явилось использование методов электрофоретического

анализа изоферментов и произвольно амплифицированной полиморфной ДНК (RAPD) для паспортизации штаммов вешенки обыкновенной и шиитаке.

Экспериментальный материал грибов, вегетативного мицелия тринадцати штаммов *P. ostreatus* и десяти штаммов *L. edodes* был взят из коллекции Института леса НАН Беларуси.

Для паспортизации штаммов *P. ostreatus* проводили изоферментный анализ с использованием метода электрофореза в крахмальном геле [2]. В ходе исследований было использовано 7 ферментных систем.

Таблица 1

Аллозимные генотипы тринадцати штаммов *P. ostreatus*

№ штамма	Gpi	Adh	Idh	Mdh-2	Lap-2	Sod	Aat-2
1	1.00	1.00	1.00	1.25	0.90	1.00	1.00
2	0.80/1.00	1.00	1.00	1.25	1.00	1.00	1.00
3	1.00	1.00	0.95/1.00	1.00/1.25	1.00	1.00	1.00
4	1.00/1.20	1.00	0.95/1.00	1.25	1.00	1.00	1.00/1.50
5	1.00	1.00	1.00	1.25	0.90/1.00	1.00	1.00
6	0.80/1.20	1.00	1.00	1.00/1.25	0.95/1.00	1.00	1.00
7	1.00	1.00	1.00	1.25	0.90	1.00	1.00
7п	1.00	1.00	1.00	1.25	0.95/1.00	1.00	1.00
8	1.00	1.00	1.00	1.25	0.90/1.00	1.00	1.00
10	0.80/1.20	1.00	0.95/1.00	1.00/1.25	0.90/0.95	1.00	1.00
11	1.00	1.00	1.00	1.25	0.90	1.00	1.00
14	1.00/1.30	1.00	1.00	1.25	0.90/1.00	1.00	1.00
16	1.00/1.30	1.00	1.00	1.25	0.90	1.00	1.00

Таблица 2

Название использованных праймеров, их размер, нуклеотидный состав, молекулярная масса, температура отжига, количество выявленных и полиморфных зон

Название праймера	Размер	Нуклеотидная последовательность (5-3)	Молекулярная масса, г/моль	Температура отжига, °С	Кол-во выявленных зон	Кол-во полиморфных зон
Oligo 5	10	GATCTCAGCG	3027,9	28,7	3	3
Oligo 11	10	TCCCGAACCG	2972,9	45,0	4	2
Oligo 19	10	CCGCATCTAC	2947,9	30,0	2	1
Oligo 22	10	GACGTGGTGA	3108,0	28,9	4	2

В ходе работы для всех штаммов определены генотипы по изученным изоферментным локусам. Среди 13 штаммов вешенки обыкновенной (см. табл. 1), восемь (№ 2, № 3, № 4, № 6, № 7п, № 10, № 14 и № 16) имели уникальные генетические портреты. Остальные 5 штаммов (№ 5, № 8 и № 1, № 7, № 11) разделились на две группы, между которыми выявлены различия по Lar-2. Однако в пределах этих групп штаммы по исследованным локусам не отличались друг от друга.

Таким образом, даже использование только 7 генов позволило провести генетическую идентификацию большинства изученных штаммов вешенки. Увеличение выборки изоферментных локусов даст возможность выявить генетические различия и у остальных штаммов. Исследованные ферментные системы после проведения генетического анализа будут использованы в качестве генетических маркеров в селекционной работе со штаммами вешенки обыкновенной.

Для паспортизации штаммов *L. edodes* мы использовали метод произвольно амплифицированной полиморфной ДНК (RAPD).

Препараты ДНК выделяли согласно методике, предложенной Дороховым и Клоке [3]. Состав ПЦР смеси соответствовал рекомендациям компании-изготовителя (PCR CORE KIT, «Sigma»). Список использованных в данном исследовании праймеров, их нуклеотидный состав, молекулярная масса и температура отжига приведены в табл. 2. Полимеразную цепную реакцию проводили по стандартной программе [4]. Электрофоретическое разделение продуктов ПЦР осуществляли в агарозном геле [5]. Визуализация продуктов электрофореза достигалась окрашиванием гелевых пластин в растворе бромистого этидия [5].

В ходе ПЦР анализа 4 десятинуклеотидных праймеров штаммов шиитаке удалось выявить 13 амплимерных зон, 8 из которых у исследованных штаммов были полиморфны. Исходя из RAPD-спектров для каждого из штаммов был составлен многолокусный генетический портрет.

Среди 9-ти проанализированных штаммов шиитаки, семь (№ 101, № 193, № 194, № 195, № 197 П, № 364, и № 370) имели уникальные генотипы. Остальные 2 штамма (№ 197 I и № 214) в пределах анализируемых праймеров не отличались друг от друга.

Таким образом, использование изоферментных и RAPD-маркеров является удобным методом для паспортизации штаммов вешенки обыкновенной и шиитаке. С помощью данных методов можно составить уникальный многолокусный портрет (генетический паспорт) для каждой культуры, что позволяет использовать эти данные в ходе селекционных мероприятий, при анализе чистоты культур, защите авторских прав при создании новых штаммов и др.

Литература

1. Трухоновец В.В., Бабицкая В.Г., Щерба В.В. Сравнительная оценка химического состава и антиокислительной активности плодовых тел и глубинного мицелия съедобных базидиальных грибов *Pleurotus* и *Lentinus* // Проблемы лесоведения и лесоводства: Сб. науч. тр. / Институт леса НАНБ. – Гомель, 2001. – Вып. 52. – С. 90–114.
2. Гончаренко Г.Г., Падутов В.Е., Потенко В.В., Руководство по исследованию хвойных видов методом электрофоретического анализа изоферментов. – Гомель, Госкомитет СССР по лесу, 1989. – 64 с.
3. Дорохов Д.Б., Клоке Э. Быстрая и экономичная технология RAPD анализа растительных геномов // Генетика. – 1997. – Т. 33, № 4. – С. 443–450.
4. Использование ПЦР-анализа в генетико-селекционных исследованиях: Научно-методическое руководство / Под ред. Ю.М. Сиволапа. – Киев: Аграрна наука, 1998. – 156 с.
5. Westemeier R. Electrophoresis in practice (Third Edition). – WILEY VCH Verlag: Weinheim. – 2001. – 349 p.