

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОРАЖЕНИЯ ДРЕВЕСИНЫ РАЗЛИЧНЫМИ ВИДАМИ ГРИБОВ ПУТЕМ ВЫДЕЛЕНИЯ ДНК И СРАВНЕНИЯ ИХ С ДНК-МАРКЕРАМИ

In the article the problems of wood which arised in the process of exploitation are analysed. Principal views of biological agents damaging wood and optimum conditions of their development are considered. Existing methods of diagnosis of mushrooms in wood (macroscopical, microscopic, pure cultures and biochemical) are characterised. It is offered to lead the identification of mushrooms in wood with high speed and degree of reliability by allocation of DNA of cultures of mushrooms and their comparison with DNA-markers. Application of this technique has allowed to detect presence of mushrooms by means of DNA-prajmerov application. And we can detect them even if at the sample there will be only one cell of the investigated attacking biological agent. The given method can be used for determination of cleanliness of strains of mushrooms, determination of enzymes allocated with mushrooms for the ability to live and exploitation of counteracting means, determination of presence of fungous attacks in archaeological and destruct wood.

Введение. Древесина при ее хранении и эксплуатации подвергается разрушению под действием биологических агентов: плесневых, деревоокрашивающих, дереворазрушающих, (домовых, почвенных, атмосферных, и аэробных), грибов, насекомых, моллюсков [1]. При поражении плесневыми и деревоокрашивающими грибами древесина изменяет цвет, покрывается плесенью, синевой, теряет товарный вид, увлажняется. Таким образом, создаются благоприятные условия для роста дереворазрушающих грибов. Развитие грибов на древесине возможно при определенных температурно-влажностных условиях: минимальная температура 0–5°C, максимальная 45–50°C, минимальная влажность древесины 18–20%, максимальная 120–150% [2]. Древесина, пораженная дереворазрушающими грибами, теряет прочность, подвергается деструкции и разрушается. Наиболее эффективным методом противодействия развитию грибов является применение защитных средств, противодействующих их развитию. Защитные мероприятия и средства защиты древесины от повреждения регламентированы соответствующими ГОСТами или техническими условиями. Особенно важно при постановке на производство древесины, пропитанной новыми составами, выпуске новых защитных средств или внедрении в производство импортных защитных средств строго соблюдать требованиям ГОСТ 30704 и ГОСТ 30495, ГОСТ 30219-95 [3, 4]. При отсутствии испытаний, регламентированных этими документами, следует не допускать использование соответствующих защитных средств. Особенно тщательно необходимо подходить к определению биозащитных свойств применяемых и разрабатываемых препаратов согласно требованиям ГОСТов [3, 4]. Высокие требования предъявляются к деревянным строениям древнего зодчества, поскольку их необходимо не только защитить, но и сохранить в неразрушенном состоянии.

Определение многочисленных видов поражающих грибов макроскопическим, микроскопическим и биохимическим методами, выделение и идентификация чистых штаммов, необходимых для определения токсичности защитных средств, крайне трудоемкая и длительная процедура. Определение отдельных видов грибов практически невозможно из-за отсутствия в собранном материале плодовых тел или спор, деградации мицелия, а также наличия грибных поражений в недоступных местах. В последнее время в медицине широкое распространение получил метод исследования инфекционных заболеваний путем выделения ДНК поражающих вирусов, их репликации с помощью полимеразной цепной реакции, разработанной Кэри Мюллисом (фирма «Getus», США) [5]. Этот метод молекулярной биологии позволяет добиться значительного увеличения малых концентраций определенных фрагментов дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) в биологическом материале (пробе). Известны труды по разработке методов выявления и идентификации различных видов микробактерий *M. tuberculosis*. Анализ последовательности гена, кодирующего один из антигенов микробактерий, позволил сконструировать специфические праймеры для диагностики бактерий этого вида [6]. Широко рассмотренные вопросы общей генетики и молекулярно-генетических исследований различных объектов и человека, а также методов молекулярно-генетического анализа, которые применяются для решения различных проблем в биологических исследованиях [7, 8], позволили обоснованно сделать предположение о возможности применения методов анализа ДНК для определения и идентификации многочисленных видов поражающих древесину грибов.

В результате проведенного анализа и обобщения опыта определения видов грибов, поражающих древесину, принято решение найти

более перспективный, быстрый и точный метод идентификации биоразрушителей древесины.

Целью данной работы явилось обобщение опыта определения видов грибов, поражающих древесину, и разработка нового метода их исследования путем выделения ДНК культур грибов и сравнения их с ДНК-маркерами. Применение этой методики позволяет обнаружить наличие грибов и в том случае, если в образце будет присутствовать только одна клетка исследуемого поражающего гриба.

Основная часть. Проведенный анализ существующих методов диагностики грибов в древесине позволил выделить при определении вида грибов следующие случаи [9]:

- 1) когда на зараженной древесине имеются плодовые тела гриба;
- 2) когда на древесине есть хорошо развитая грибница и шнуры гриба;
- 3) когда на древесине имеются только следы грибницы или грибница совсем отсутствует.

В первых двух случаях определение вида гриба возможно с помощью макроскопического и микроскопического методов, метода чистых культур и др. Для микроскопического анализа подготавливаются срезы древесины на микротоме, например на микротоме МЗ-2. Микроподача столика 1–30 мкм с замороженным объектом производится автоматически. Наружная и внутренняя рамки с объектом имеют возможность поворачиваться вокруг своих осей, что дает возможность устанавливать объект в удобном для срезов положении.

Макроскопический и микроскопический методы заключаются в анализе особенностей строения мицелия, плодовых тел, спор и т. д. Для этого часто используются различные способы окрашивания микротомных срезов древесины [10], зараженной дереворазрушающими грибами. При этом в зависимости от красителя гифы грибов и древесина окрашиваются в разные цвета.

Метод чистых культур состоит в том, что из грибницы или из древесины выделяется чистая культура гриба, которая затем культивируется на различных питательных средах и определяется путем сравнения с ростом заведомо известных грибов, выращенных на таких же питательных средах. Для полного развития гриба в культуре до появления характерного цвета грибницы, образования шнуров и зачатков плодовых тел требуется иногда 2–4 месяца.

Идентификацию грибов ведут по определителям [11, 12, 13].

Предлагаются для диагностики грибов и другие способы, например биохимический [9]. Способ состоит в изучении отношения грибов к различным источникам углеродистого питания, например углеводам (декстроза, мальтоза, крахмал и пр.), органическим кислотам или

к различным источникам азотистого питания (пептон, нитраты, и пр.), а также в изучении продуктов жизнедеятельности гриба на искусственной питательной среде (определение кислотности среды, определение ферментативного действия гриба). Данные методы не нашли широкого применения в связи со своей сложностью и недоработанностью.

Третий случай, когда на древесине имеются только следы грибницы или грибница совсем отсутствует, наиболее сложный. Он часто имеет место при работе с археологической или сильно деструктированной древесиной (рис. 1), пропитанной древесиной (рис. 2), например шпалы, столбы, виноградные колья и т. д., когда грибница в древесине является не жизнеспособной и не дает роста ни на искусственной питательной среде, ни в банках.



Рис. 1. Археологическая древесина



Рис. 2. Пропитанная деструктированная древесина

В таких случаях определение вида гриба, произведшего разрушение, становится вышеперечисленными методами невозможным.

Определение по макроскопическому и микроскопическому методам возможно от 1000 макромолекул культуры гриба.

В качестве альтернативы существующим методам предлагается ускоренный метод идентификации грибов в древесине с высокой степенью достоверности путем выделения ДНК и сравнения их с ДНК-маркерами.

Методика основана на проведении анализа с использованием метода полимеразной цепной реакции (ПЦР). В основе метода ПЦР лежит природный процесс – комплементарное достраивание ДНК матрицы (их консервативной

области), для которой создается искусственный ДНК-праймер, который приклеивается к грибу и дает сигнал ферменту ДНК-полимеразе отклонировать, и фермент копирует этот слипшийся фрагмент. Эта реакция носит название репликации ДНК.

Для проведения амплификации необходимы следующие компоненты.

1. ДНК-матрица (ДНК или ее часть, содержащая искомый специфический фрагмент).

2. Праймеры – синтетические олигонуклеотиды (20–30 нуклеотидных пар).

3. Комплементарные последовательности ДНК на границах определяемого специфического фрагмента. Выбор специфического фрагмента и подбор праймеров играют важнейшую роль в специфичности проведения амплификации, что сказывается на качестве проведения анализа.

4. Смесь дезоксинуклеотидтрифосфатов (дНТФ). Смесь четырех дНТФ является материалом для синтеза новых комплементарных цепей ДНК.

5. Фермент Таq-полимераза – термостабильная ДНК-полимераза, катализирующая удлинение цепей праймеров путем последовательного присоединения нуклеотидных оснований к растущей цепи синтезируемой ДНК.

6. Буферный раствор – реакционная среда, содержащая ионы Mg^{2+} , необходимые для поддержания активности фермента.

Для получения достаточного количества копий искомого характеристического фрагмента ДНК амплификация включает несколько (20–40) циклов.

Каждый цикл амплификации включает 3 этапа, протекающие в различных температурных режимах:

1) денатурация ДНК (расплетение двойной спирали, расхождение нитей ДНК);

2) образование коротких двухцепочечных участков ДНК (затравок, необходимых для инициации синтеза ДНК);

3) синтез новой цепи ДНК (комплементарное достраивание обеих нитей).

Предлагаемая методика идентификации грибов включает следующие этапы.

Первый этап: выделение ДНК из образца древесины. Этап включает в себя следующее:

– Разрушение образца (его клеточной структуры) с помощью специальных реагентов, ПАВ и ряда манипуляций (хорошие результаты дает растирание в жидком азоте).

– Очистка ДНК от разрушенных клеточных структур, высоко- и низкомолекулярных соединений. Убираются белки, полисахариды, жиры, фенолы и разрушенные клеточные элементы и прочее и получается раствор ДНК.

– Осаждение ДНК изопропанолом или этанолом. Чистоту полученных препаратов оценивают спектрофотометрическим способом.

Раствор ДНК представлен генетическим материалом всех разрушенных клеток, т. е. ДНК из хромосом, митохондрий и хлоропластов клеток, и называется препаратом суммарной ДНК.

Второй этап: амплификация специфических фрагментов ДНК. Амплификация – увеличение числа копий ДНК. В клетке амплификация происходит в результате репликации ДНК. В искусственных условиях увеличения числа копий ДНК добиваются с помощью полимеразной цепной реакции. Полимеразная цепная реакция – экспериментальный метод, позволяющий добиться значительного увеличения малых концентраций определенных фрагментов нуклеиновой кислоты (ДНК) в биологическом материале (пробе).

Третий этап: детекция продуктов амплификации. Для этого осуществляется горизонтальный электрофорез ПЦР продуктов в 1%-ном агарозном геле с добавлением бромид эдидиума для окраски. Полученный сегмент ДНК надежно выделяется в виде дискретной полосы после электрофоретического разделения молекул. Визуализация полученных продуктов ПЦР проводится в ультрафиолетовом свете (рис. 3).

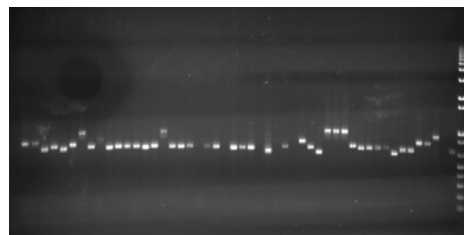


Рис. 3. ДНК спектры ПЦР различных грибов

Четвертый этап: секвенирование. В результате отсеквенирования гена (расшифровки структуры ДНК) получается сиквенс.

Пятый этап: анализ информации в генном банке (база данных).

Оценка эффективности предложенного метода определения грибов проведена путем выделения ДНК и сравнения их с ДНК-маркерами при тестировании контрольных образцов древесины, пораженной грибом *Coniophora puteana*.

Образцы натуральной древесины сосны были заражены штаммом указанного гриба (рис. 4).



Рис 4. Образцы сосны, зараженной чистой культурой *Coniophora puteana*

Определение вида гриба вели следующим образом:

1) получение информации в генном банке о структуре и размере гена *Coniophora puteana*. Размер гена *Coniophora puteana* оказался равным цепочке в 712 пар нуклеотидов;

2) анализ образца, зараженного грибом, по приведенной выше методике.

Результаты исследований показаны на рис. 5.

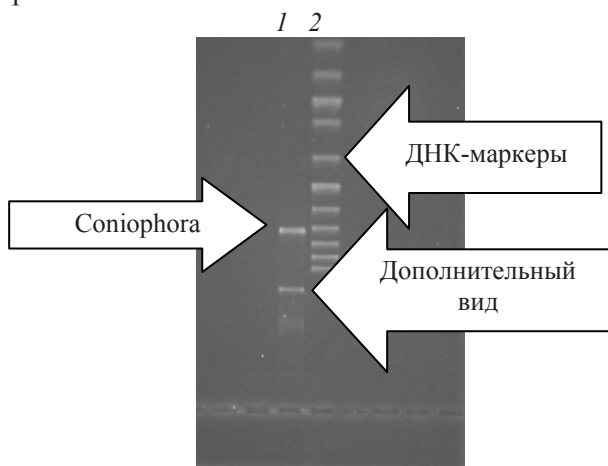


Рис. 5. Детекция продуктов амплификации:
1 – ПЦР-матрица искомая ДНК(контроль);
2 – ДНК-маркер

Полоса 1 – выделенная ДНК исследуемого гриба – равна 712 нуклеотидам, что соответствует гену гриба *Coniophora puteana*. Обнаруженный в древесине гриб на 98,7% совпадает по структуре с ДНК, имеющимися в базе данных, с *Coniophora puteana*, но имеется и дополнительный вид, определение которого требует проведения дополнительных исследований.

Выводы. 1. Определение многочисленных видов поражающих грибов макроскопическим, микроскопическим, чистых культур и биохимическим методами требует много времени и трудозатрат, а на сильно деструктированной древесине практически невозможно.

2. Предложено идентификацию грибов в древесине вести с высокой скоростью и степенью достоверности путем выделения ДНК культур грибов и сравнения их с ДНК-маркерами.

3. Данный метод может быть использован: для поддержания чистоты штаммов грибов; определения видовой принадлежности неизвестных штаммов; определения ферментов, выделяемых грибами для жизнедеятельности и

разработки противодействующих защитных средств; исследования поражения древесины грибами в случаях, при которых проведение макро- и микроанализа не представляется возможным: при работе с археологической древесиной, пропитанной древесиной (шпалы, столбы и т. д) и др.

Литература

1. Горшин, С. Н., Консервирование и защита древесины. – М.: Лесная пром-сть, 1977. – С. 336.
2. Серговский, П. С. Гидротермическая обработка древесины. – М.: Лесная пром-сть, 1987. – С. 289–291.
3. Защитные средства для древесины. Методы контроля: ГОСТ 30704-2001. – Введ. 01.07.2002. – Минск: Межгос. совет по стандартизации, метрологии и сертификации: Госстандарт, 2001. – 8 с.
4. Средства защитные для древесины. Общие технические условия: ГОСТ 30495-2006. – Введ. 01.07.2007. – Минск: Межгос. совет по стандартизации, метрологии и сертификации: Госстандарт, 2007. – 8 с.
5. Херрингтон, С. Молекулярная клиническая диагностика. Методы. – М., 1999. – 558 с.
6. Detection and identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA amplification / C. C. Pao [et al] / J. Clin Microbiol. – 1990. – Vol. 28. – P. 1877–1880.
7. Генетика / В. И. Иванов [и др.]. – М.: Академкнига, 2006. – 640 с.
8. Падутов, В. Е. Методы молекулярно-генетического анализа / В. Е. Подутов, О. Ю. Баранов, Е. В. Воропаев. – Минск: Юнипол, 2007. – 176 с.
9. Ванин, С. И. Домовые грибы, их биология, диагностика и меры борьбы / С. И. Ванин. – Л., 1930. – 112 с.
10. Защита продукции из древесины / сост. В. Г. Русаленко, В. Б. Звягинцев. – Минск: БГТУ, 2005. – 66 с.
11. Мейер, Е. И. Определитель деревоокрашивающих грибов / Е. И. Мейер. – М.: Л., 1953.
12. Бондарцев, М. А. Определитель грибов России. Порядок афиллофоровые / М. А. Бондарцев. – 2-й вып. – СПб.: Наука, 1998. – 391 с.
13. Бондарцев, А. С. Пособие для определения домовых грибов / А. С. Бондарцев. – М.: Л.: Ан СССР, 1956. – 79 с.