

С. В. Пантелеев, мл. науч. сотрудник;  
О. Ю. Баранов, вед. науч. сотрудник (ГНУ «Институт леса НАН Беларуси»)

**МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА БОЛЕЗНЕЙ КУЛЬТУР  
*PLEUROTUS OSTREATUS* (FR.) KUMM. И *LENTINUS EDODES* (BERK.) SING.  
В УСЛОВИЯХ ПРОМЫШЛЕННОГО ПРОИЗВОДСТВА ГРИБОВ**

Molecular genetic investigation of mould fungi from infected substrates, which are used for industrial cultivation of *Pleurotus ostreatus* (Fr.) Kumm. and *Lentinus edodes* (Berk.) Sing., was carried out. Main four species from genera *Penicillium*, *Aspergillus*, *Trichoderma* and *Mucor* were detected.

**Введение.** В настоящее время в грибном производстве во всем мире встает проблема заражения инфекцией культур выращиваемых грибов в условиях промышленного производства.

Для определения вида инфекции пользуются морфологическим, гистологическим, микологическим, физическим, химическим и физиологическим методами.

При использовании морфологического метода выявление и типирование различных заболеваний зачастую проводят уже при наличии явных симптомов болезни. Кроме того, данный метод не позволяет точно определить возбудителя, т. к. сходные симптомы болезней субстратов могут быть вызваны различными видами организмов.

Для установления видовой принадлежности для грибных инфекций используют в основном микроскопический метод. Определение ведут по особенностям строения мицелия, плодовых тел, спор. Однако проведение достоверного анализа пораженных субстратов может быть затруднено при отсутствии в собранном материале плодовых тел или спор, деградации мицелия, наличия чужеродных примесей, структур и др. Поэтому для микроскопического метода оптимальным является изучение чистых культур, которые создаются путем изоляции инфицирующего агента из собранного материала и выращиванием его в лабораторных условиях на специальных питательных средах. К недостаткам метода анализа чистых культур является длительность исследований, их трудоемкость и отсутствие специфических сред для каждого конкретного вида. Кроме того, некоторые грибные организмы в культуре могут терять стадию полового процесса, что делает данные культуры непригодными для видовой идентификации. Особые требования предъявляются также и к уровню квалификации персонала, проводящего культивирование и определение микроорганизмов.

Изучение особенностей обмена веществ и биохимического состава клеток ряда грибов позволило разработать химические экспрестесты, выявляющие инфекции. Однако существующее разнообразие таких тестов невелико и, как правило, для получения четкой положительной реакции требуются высокий уровень зараженности субстрата.

Наиболее современными и перспективными способами диагностирования инфекций являются методы, основанные на анализе молекул ДНК. К настоящему времени ДНК-маркеры нашли свое широкое применение и получили длительную апробацию в различных областях медицины – для выявления и профилактики инфекционных заболеваний. Преимуществами ДНК-маркеров перед остальными группами методов являются ранняя диагностика болезней, точность определения и быстрота выполнения анализов.

Интерпретация данных, полученных с помощью ДНК-анализа, является процедурой несложной и сводится к визуальной оценке наличия/отсутствия ДНК инфекционного агента в образце. Также существует ряд компьютерных программ, позволяющих автоматизировать процесс анализа. Количественное определение содержания инфекции в образце проводится с помощью одного из разновидностей ДНК-анализа – RealTime PCR.

За последние десятилетия для большинства хозяйственно важных грибных организмов расшифрованы некоторые фрагменты ДНК их генома. Данная информация представлена для открытого доступа на сайте Генного банка и ежедневно пополняется. Имеющиеся нуклеотидные последовательности позволяют разработать ДНК-зонды для выявления практически любого вида. С другой стороны, если данный вид является новым или данные о нем в Генном банке отсутствуют, то с помощью специального прибора – секвенатора – можно провести расшифровку ДНК этого вида.

Целью работы являлось определение видового состава плесневых грибов в образцах мицелия и спор, собранных в различных помещениях КУП «Домановичский овощесушильный завод» при культивировании вешенки обыкновенной *Pleurotus ostreatus* (Fr.) Kumm. и считае *Lentinus edodes* (Berk.) Sing.

**Материалы и методика.** Первоначально с субстратных блоков были собраны образцы, которые представляли собой фрагменты мицелия и спор грибов, и упакованы в отдельные центрифужные пробирки типа Eppendorf (1,5 мл).

На первом этапе исследования проводилось выделение суммарной ДНК плесневых

грибов СТАВ-методом. Для выделения ДНК грибов использовали следующие компоненты: экстрагирующий буфер А (СТАВ 2%, Трис-НСl 0,1М, NaCl 1,4М, EDTA 20мМ), экстрагирующий буфер В (СТАВ 5%, EDTA 350мМ), осаждающий буфер С (СТАВ 1%, Трис-НСl 50мМ, EDTA 10мМ), растворяющий буфер D (NaCl 1М, Трис-НСl 10мМ, EDTA 1мМ), хлороформ, ацетат аммония 7,5М, изопропанол, этанол 70%-ный [1, 2].

Далее препараты ДНК исследовались при помощи PCR метода (полимеразной цепной реакции), суть которого сводится к амплификации рибосомальных локусов ДНК плесневых грибов. В ходе анализа использовались следующие реагенты: Реакционная ПЦР-смесь имела следующий состав: 10-кратный ПЦР-буфер (Трис-НСl (рН 9,0) 100 мМ, KCl 500 мМ, MgCl<sub>2</sub> 25 мМ) – 2,5 мкл; вода (MilliQ) – 17,8 мкл; смесь нуклеотидтрифосфатов (10 мМ р-р каждого) – 0,5 мкл; праймеры: ITS1(10 мкМ р-р) – 0,25 мкл; ITS4 (10 мкМ р-р) – 0,25 мкл; ДНК-полимераза (5 ед./мкл) – 0,2 мкл; образец ДНК (20 нг/мкл) – 1 мкл [3, 4].

Амплификацию проводили по следующей программе: 1 этап (1 цикл) – денатурация:  $t = 3$  мин,  $T = 94^{\circ}\text{C}$ . 2 этап (30–40 циклов) – денатурация:  $t = 30$  с,  $T = 94^{\circ}\text{C}$ ; отжиг:  $t = 30$  с,  $T_a$  (температура отжига) =  $T_{\text{плав}} - 2^{\circ}\text{C}$  и составляет для выбранных праймеров  $57,0^{\circ}\text{C}$ ; элонгация:  $t = 45$  с,  $T = 72^{\circ}\text{C}$ . 3 этап (1 цикл) – элонгация:  $t = 7$  мин,  $T = 72^{\circ}\text{C}$ ; охлаждение реакционной смеси:  $t = 5$  мин,  $T = 4^{\circ}\text{C}$  [5–8].

Электрофоретическое фракционирование полученных ампликонов проводилось в 1%-ном агарозном геле. Для электрофоретического фракционирования использовались следующие реагенты: Трис-ЭДТА-Боратный (ТВЕ) буфер 1x (рН 8,3) (Трис – 12,1 г, борная кислота – 5,1 г, ЭДТА – 0,37 г, дисцилированная вода – 1000 мл), агароза с высокой способностью разделения (разделение < 1000 п. о.).

Последующее изучение проводилось по стандартной методике видовой идентификации на основании анализа фрагментов ДНК рибосомальных локусов ITS1-5,8S RNA-ITS2 [9].

**Результаты.** В исследованном материале выявлено 2 вида плесневых грибов (ДНК шиитаке была исключена из анализа).

Проанализированные образцы обладают генетическим сходством (по базе данных NCBI):

1) вид № 1 на 98,2% с *Hypocrea lixii* (анаморфа *Trichoderma harzianum*);

2) вид № 2 на 97,9% с *Penicillium chrysogenum*.

Зеленая плесень, вызываемая *Trichoderma harzianum* (триходерма), может быть описана как агрессивный, белый мицелий, растущий в основном на опилочных грибных субстратах и приводящий к загниванию блоков. Со временем образует огромную массу ярко-зеленых

спор. Триходерма является не только пищевым конкурентом с вешенкой обыкновенной (*Pleurotus ostreatus*) и сиитаке (*Lentinus edodes*), но и паразитирует на их мицелии. На данный момент это наиболее встречающееся заболевание в грибной индустрии повсеместно [10].

*Trichoderma* часто ошибочно принимается за *Penicillium* или *Aspergillus* (и соответственно, наоборот). Выглядят все 3 вида очень похоже, и бывает сложно их различить классическими методами идентификации [11].

*Penicillium chrysogenum* – сине-зеленая плесень. На поверхности субстрата образует множество зелено-голубых спор. Похожа на многие виды рода *Aspergillus*. Этот вид плесени весьма распространен при выращивании культивируемых грибов, особенно это касается обогащенных питательных сред. Споры переносятся по воздуху и распространены повсеместно [12].

На основании выявления заражения субстратных блоков, используемых для выращивания в производственных условиях грибов сиитаке и вешенки, плесневыми грибами на КУП «Домановичский овощесушильный завод», проведена генетическая экспертиза в лаборатории генетики и биотехнологии образцов культур плесневых грибов, выращенных из спор, которые были собраны в различных культивационных помещениях КУП «Домановичский овощесушильный завод» методом осаждения.

Образцы представляли собой грибной мицелий, растущий на агаризованной среде в чашках Петри. Визуально в чашках определялось одновременное наличие различных видов плесневых грибов. Каждая чашка была маркирована и указана информация о месте сбора спор.

Из каждой чашки были взяты по 1 образцу наиболее развитого мицелия. В исследованном материале выявлены различные штаммы 4 видов плесневых грибов, из которых идентифицировано 3.

Идентифицированные грибы обладают генетическим сходством (по базе данных NCBI): 8 исследованных образцов идентифицированы как гриб *Mucor fragilis*. 11 как *Penicillium chrysogenum*. 3 образца как гриб *Aspergillus flavus*. Четвертый вид, представленный в 3 образцах, не был идентифицирован вследствие низкого качества секвенирующей реакции.

*Mucor fragilis* – широко распространенный гриб в верхних слоях почвы, и тем самым вполне мог быть занесен в помещение извне при нарушении условий стерильности.

Поскольку в исследованном материале мицелия из чашек Петри и в материале, собранном с субстратных блоков, был идентифицирован *Penicillium chrysogenum*, можно прийти к выводу, что споры данного гриба были занесены в комнаты, специализированные для культивирования, из других помещений.

Следующий идентифицированный нами гриб *Aspergillus flavus* способен расти на различном субстрате, в т. ч. и на строительном материале.

В целом все виды плесени должны стать предметом пристального внимания со стороны грибоводов, т. к. могут стать причиной аллергических заболеваний, вплоть до удушья. В особенности это касается гриба *Aspergillus flavus*, который вызывает один из видов удушья, называемый аспергиллез, или «Болезнь грибовода» [13].

**Заключение.** В исследованном материале, собранном с субстратных блоков, выявлено 2 вида плесневых грибов: *Hypocrea lixii* (анаморфа *Trichoderma harzianum*), *Penicillium chrysogenum*.

В материале, собранном с чашек Петри методом осаждения, идентифицировано 3 вида: *Mucor fragilis*, *Penicillium chrysogenum*, *Aspergillus flavus*.

На основе полученных данных можно сделать вывод, что заражение культивируемых грибов вешенки обыкновенной (*Pleurotus ostreatus*) и шиитаке (*Lentinus edodes*) плесневыми грибами произошло в результате нарушения установленного режима стерильности.

Для профилактики заражений обязательны стерилизационные и дезинфекционные работы, а также обеспечение персонала на данных предприятиях масками и респираторами для защиты органов дыхания от спор болезнетворных грибов.

### Литература

1. Молекулярно-генетические методы идентификации организмов / В. Е. Падутов [и др.] // Проблемы лесоведения и лесоводства: сб. науч. тр. – 2005 – Вып. 64. – С. 189–196.

2. Падутов, В. Е. Методы молекулярно-генетического анализа / В. Е. Падутов, О. Ю. Баранов, Е. В. Воропаев. – Минск: Юнипол, 2007. – 176 с.

3. Rogers, S. O. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues / S. O. Rogers, A. J. Bendich // Plant Molecular Biology. – 1985. – Vol. 5. – P. 69–76.

4. Robert, S. S. Amplification of nucleic acid sequences: the choices multiply / S. S. Robert // J. NIH Res. 3(2), 1991. – P. 81–94.

5. Rauno, G. PCR: The first few cycles / G. Rauno, D. E. Brash, K. K. Kidd // Perkm-Elmer Cetus Amplifications 7. 1991. – P. 1–4.

6. Maniatis, T. Molecular Cloning: a Laboratory Manual / T. Maniatis, J. Sambrook, E. F. Fritsch. – Cold Spring Harbor: Laboratory Press, 1989. – 324 p.

7. Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction / M. Orita [et al.] // Genomics 1989. – P. 874–879.

8. Rychlik, W. Optimization of the annealing temperature for DNA amplification in vitro / W. Rychlik, W. J. Spencer, R. E. Rhoads // Nucleic Acids Res. – 1990. – № 18. – P. 6409–6412.

9. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics / T. J. White [et al.] // PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. – New York: Academic Press, Inc., 1990 – P. 315–322.

10. Гарибова, Л. В. Обзор и анализ современных систем грибов / Л. В. Гарибова. – Петрозаводск: Инст. леса Карельского НЦ РАН, 1999. – 23 с.

11. Мир растений: в 7 т. / под ред. М. В. Горленко. – 2-е изд. – М.: Просвещение, 1991. – Т. 2: Грибы. – 475 с.

12. Stamets, P. Mushroom Cultivator: a Practical Guide to Growing Mushrooms at Home / P. Stamets, J. S. Chilton // Homestead Book Co. – 1984. – 415 p.

13. Plant Pathology 40, Edible Mushroom Cultivation Lecture / Lab 8 Pest, Diseases, and Weed Control; Abnormalities, Febr. 26. – 1999. – P. 80–96.