

экстрагируемым. Например, путем модификации биосинтеза лигнина удалось снизить его содержание в растениях осины на 40-50%. В растениях также можно экспрессировать ферменты гидролиза клеточной стенки для деградации целлюлозы.

Кроме того, с помощью генной инженерии можно повысить продуктивность культур для биоэнергетики. Наиболее перспективными направлениями здесь являются повышение устойчивости к различным стрессам, улучшение ассимиляции азота и модификация метаболизма углеводов. Например, растения тополя с геном глутаминсинтетазы показали увеличение скорости роста на 20-40%. Блокирование цветения, направленное в первую очередь на предотвращение утечки трансгенов с пыльцой, также может способствовать увеличению биомассы.

УДК 674.048.3:582.28:577.113.085

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА И ИДЕНТИФИКАЦИЯ ГРИБОВ РАЗРУШАЮЩИХ ДРЕВЕСИНУ

О.К. Леонович, О.Ю. Баранов, И.К. Божелко

УО «Белорусский государственный технологический университет», г. Минск, Республика Беларусь

ГНУ «Институт леса НАН Беларуси», г. Гомель, Республика Беларусь

Древесина при ее хранении и эксплуатации подвергается разрушению под действием биологических агентов: плесневых, деревоокрашивающих, доразрушающих (домовых, почвенных, атмосферных, и аэробных) грибов, насекомых, моллюсков [1]. Развитие грибов на древесине возможно при определенных температурно-влажностных условиях: минимальная температура 0–5⁰С, максимальная 45–50⁰С, минимальная влажность древесины 18–20%, максимальная 120–150% [2]. Древесина, пораженная доразрушающими грибами, теряет прочность, подвергается деструкции и разрушается. Защитные мероприятия и средства защиты древесины от биоповреждения регламентированы ГОСТ 30704 и ГОСТ 30495, ГОСТ 30219-95 [3,4,5].

Целью данной работы является сравнительный анализ классических методов определения видов грибов поражающих древесину и разработка нового подхода с применением современных методов ДНК-маркирования.

При определении вида грибов выделяют следующие случаи [2]: 1) когда на зараженной древесине имеются плодовые тела гриба; 2) когда на древесине

не имеются 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. 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 [6,7], зараженной дереворазрушающими грибами.

Метод чистых культур состоит в том, что из древесины выделяется чистая культура гриба, которая затем культивируется на различных питательных средах и определяется путем сравнения с заведомо известными грибами, 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 [8,9,10].

Предлагаются для диагностики грибов и другие способы, например, биохимический метод [11]. Данный способ является сложным и недоработанным.

Третий случай, когда на древесине имеются только следы грибницы или грибница совсем отсутствует наиболее сложный. Он часто имеет место при работе с археологической, а также пропитанной древесиной (шпалы, столбы, виноградные колья и др.), когда грибница в древесине является не жизнеспособной и не дает роста ни на искусственной питательной среде, ни в банках. В таких случаях определение вида гриба, производшего разрушение, становится вышеперечисленными методами невозможным.

Наиболее современными и перспективными способами диагностики присутствия грибной флоры и проведения видовой идентификации являются методы, основанные на анализе ДНК.

К настоящему времени ДНК-маркеры нашли свое широкое применение и получили длительную апробацию в различных областях медицины, криминалистики, биологии – для выявления и определения различных видов микроорганизмов, включая и патогенные [13–15].

Преимуществами ДНК-маркеров, перед остальными группами методов, являются незначительное количество исследуемого образца (несколько миллиграмм), точность определения и быстрота выполнения анализов.

Целью данного исследования было отработка методов ДНК-маркирования применительно к диагностике и видовой идентификации многочисленных видов биоразрушителей древесины.

Материалом для анализа явились фрагменты деревянных конструкций различного происхождения, степени деградации и возраста. Методы ДНК-маркирования основывались на изучении различных областей рибосомальной ДНК [15]. Для видовой идентификации использовался метод секвенирования амплифицированных локусов и анализ полученных данных в Генном банке NCBI.

Методика идентификации грибов включала следующие этапы.

1. Выделение ДНК из образца древесины

Навеску образца почвы массой 500 мг помещали в центрифужную пробирку типа “Eppendorf” объемом 1,5 мл, содержащую 1000 мкл экстрагирующего буфера следующего состава: 200 мМ р-р фосфата натрия; 1 мМ дитиотрейтол (ДТТ), 100 мМ р-р хлорида натрия; 50 мМ р-р трилона Б; 0,2% р-р гексадецилтриметилбромид аммония (СТАВ), (рН буфера довести до значения 8,0).

Далее производили гомогенизацию материала при комнатной температуре путем перемешивания содержимого пробирок на вихревом смесителе (2400–2600 мин⁻¹) в течение 30 мин. После гомогенизации образцы центрифугировали при 15000×g (T = 25 °С) в течение 30 мин.

По окончании центрифугирования пипеткой отбирали 750 мкл супернатанта, и переносили в другую центрифужную пробирку типа “Eppendorf” объемом 1,5 мл и смешивали с 750 мкл хлороформа. Далее производили перемешивание содержимого пробирок на вихревом смесителе (400–600 мин⁻¹) в течение 10 мин. и далее центрифугировали при 15000×g (T = 25 °С) в течение 20 мин.

По окончании центрифугирования пипеткой отбирали 700 мкл супернатанта, переносили в другую центрифужную пробирку типа “Eppendorf” объемом 1,5 мл и добавляли 750 мкл осаждающего буфера следующего состава: 20% р-р полиэтиленгликоля (PEG) 6000 и 2,5 М р-р хлорида натрия. Содержимое пробирки перемешивали на вихревом смесителе (600 мин⁻¹) и инкубировали (T = 25 °С) в течение 30 мин. Далее производили центрифугирование при 15000×g (T = 25 °С) в течение 30 мин.

Супернатант сливали, а полученный осадок ДНК промывали 1000 мкл 65% этанола, охлажденного до температуры – 10 °С. После промывания содержимое пробирки центрифугировали при 15000×g (T = 4 °С) в течение 10 мин. Процедуру промывки проводили 2–3 раза для удаления из осадка различных примесей ингибирующих ПЦР.

Далее полученный осадок ДНК растворяли в 200 мкл дистиллированной воды, затем к раствору приливали 100 мкл 7,5М ацетата аммония (рН 7,5).

Пробирки инкубировали на ледяной бане ($T = 0^{\circ}\text{C}$) в течение 20 мин., после чего центрифугировали при $13000\times g$ ($T = 4^{\circ}\text{C}$) в течение 10 мин.

Далее к отобранному супернатанту добавляли 300 мкл охлажденного изопропанола и оставляли на 20 мин., после чего центрифугировать при $13000\times g$ ($T = 4^{\circ}\text{C}$) в течение 10 мин.

Полученный осадок ДНК промывали 1000 мкл 65% этанола, охлажденным до температуры -10°C .

После промывания содержимое пробирки центрифугировали при $15000\times g$ ($T = 4^{\circ}\text{C}$) в течение 10 мин. После промывки этанолом пробирки размещали в штативе горизонтально и, открыв крышки, просушивали осадок ДНК в течение 30–40 мин. ($T = 45^{\circ}\text{C}$) до полного испарения этанола. Высушенный осадок растворяли в 100 мкл бидистиллированной и деионизированной воды во встряхивающей ванне (200 мин^{-1}) при 40°C в течение 30 мин. Растворенную ДНК хранили при 4°C для последующего анализа.

2. Проведение полимеразной цепной реакции

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили по стандартной программе с использованием праймеров ITS1 и ITS4 [15] для амплификации фрагмента рДНК — ITS1 – 5.8S RNA – ITS2.

3. Электрофоретический анализ

Электрофоретическое фракционирование продуктов ПЦР выполнялось согласно общепринятой методике в 1,4% агарозном геле с использованием $1\times\text{TBE}$ -буфера [15].

4. Секвенирование ампликонов

Секвенирование выполнялось на генетическом анализаторе ABI PRISM 310 (Applied Biosystems) согласно инструкций, предложенных фирмой-производителем. Идентификация видов производилась на основании анализа секвенированных локусов в Генном банке NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>).

Результаты

В ходе исследования была проведена оценка эффективности предложенного метода определения грибов с помощью метода ДНК-маркирования при тестировании контрольных образцов древесины пораженной *Coniophora puteana*. В результате проведенного анализа установлено: обнаруженный в древесине гриб совпадал по генетической структуре с ДНК, имеющихся в базе данных NCBI образцами *Coniophora puteana*.

Также были проведены исследования археологической древесины, пропитанной в 1975 году фенолоспиртами. На одном из образцов эксплуатировавшемся во влажной среде обнаружено присутствие генетического мате-

риала *Serpula lacrumans*. На образце непропитанном и находящемся в земле обнаружен *Aspergillus conicus* – обычный почвенный микромицет.

Выводы

Определение многочисленных видов поражающих грибов макроскопическим, микроскопическим (включая создание чистых культур) и биохимическим методами требует много времени и трудозатрат, а их определение на сильно деструктированной древесине практически невозможно.

Использование методов ДНК-маркирования позволяет проводить идентификацию грибов в древесине в достаточно короткие сроки. Данный способ характеризуется высокой точностью и степенью достоверности.

Методы ДНК-анализа могут быть использованы для анализа чистоты штаммов грибов, определения видовой принадлежности неизвестных штаммов, определения уровня экспрессии генов, детерминирующих ферменты, выделяемых грибами для жизнедеятельности, и для оценки эффективности противодействующих фунгицидных защитных средств, для исследования поражения древесины грибами в случаях, когда проведение макро- и микроанализа не представляется возможным: при работе с археологической древесиной, пропитанной древесиной (шпалы, столбы и т.д.) и др.

Список литературы.

1. Г о р ш и н, А. Консервирование и защита древесины. М., 1971.
2. С е р г о в с к и й, П. С. Гидротермическая обработка древесины. М., 1987.
3. Защитные средства для древесины. Методы контроля: ГОСТ 30704-2001. Мн., 2001.
4. Средства защитные для древесины. Общие технические условия: ГОСТ 30495-2006. Мн., 2007.
5. Древесина огнезащитная. Общие технические требования. Методы испытаний: ГОСТ 30219-95. Мн., 1995.
6. Р и п а ч е к, В. Биология дереворазрушающих грибов. М., 1967.
7. Р у с а л е н к о, В. Г. и др. Защита продукции из древесины. Мн., 2005.
8. М е й е р, Е. И. Определитель деревоокрашивающих грибов. М.–Л., 1953.
9. Б о н д а р ц е в, М. А. Определитель грибов России. СПб., 1998.
10. Б о н д а р ц е в, А. С. Пособие для определения домовых грибов. М.–Л., 1956.
11. В а н и н, С. И. Домовые грибы, их биология, диагностика и меры борьбы. Л., 1930.
12. Х е р р и н г т о н, С. Молекулярная клиническая диагностика. 1999.
13. Р а о, С. С. et al. Derection and identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA amplification. *J. Clin Microbiol.*, 1990.
14. И в а н о в, В. И. и др. Генетика. М., 2006.
15. П а д у т о в, В. Е. и др. Методы молекулярно-генетического анализа. Мн., 2007.