

УДК: 575.174.015.3

RAPD-аналіз природних ізолятів гриба *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kummer**Н.М.Пірко¹, Д.О.Новожилов², Н.В.Дорошкевич³, О.Є.Краснопьорова², В.С.Галкіна², Я.В.Пірко¹**¹Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України (Київ, Україна)²Київський національний університет ім. Тараса Шевченка, ННЦ «Інститут біології» (Київ, Україна)³Донецький національний університет (Донецьк, Україна)

yavp@mail.ru

За допомогою RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) аналізу досліджений генетичний поліморфізм 5 ізолятів і 1 штаму *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kummer. У цілому для *P. ostreatus* рівень генетичного поліморфізму склав 92%. Описано RAPD спектри для виду при ампліфікації з праймерами OPP-12, OPP-15, OPP-17. Найбільшу кількість RAPD фрагментів відзначено для праймера OPP-15. Отримані фінгерпринти свідчать про існування генетичних відмінностей між дослідженими зразками, а також демонструють можливість використання RAPD аналізу для їх генетичної диференціації.

Ключові слова: *Pleurotus ostreatus*, ізолят, штаму, RAPD, генетичний поліморфізм.**RAPD-анализ природных изолятов гриба *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kummer****Н.Н.Пирко, Д.О.Новожилов, Н.В.Дорошкевич, О.Е.Краснопёрова, В.С.Галкина, Я.В.Пирко**

При помощи RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) анализа исследован генетический полиморфизм 5 изолятов и 1 штамма *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kummer. В целом для *P. ostreatus* уровень генетического полиморфизма составил 92%. Описаны RAPD спектры для вида при амплификации с праймерами OPP-12, OPP-15, OPP-17. Наибольшее количество RAPD фрагментов отмечено для праймера OPP-15. Полученные фингерпринты свидетельствуют о существовании генетических различий между исследованными образцами, а также демонстрируют возможность использования RAPD анализа для их генетической дифференциации.

Ключевые слова: *Pleurotus ostreatus*, изолят, штамм, RAPD, генетический полиморфизм.**RAPD-analysis of natural isolates of the fungus *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kummer****N.N.Pirko, D.O.Novozhylov, N.V.Doroshkevich, O.E.Krasnopiorova, V.S.Galkina, Ya.V.Pirko**

The genetic polymorphism of 5 isolates and 1 strain of *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kummer used RAPD analysis (Random Amplified Polymorphic DNA) was studied. The level of genetic polymorphism for *P. ostreatus* was 92%. The RAPD spectra obtained with OPP-12, OPP-15, OPP-17 were described. The greatest number of RAPD fragments observed for the primer OPP-15. Obtained fingerprints indicated the existence of genetic differences between the studied samples and have demonstrated the possibility of RAPD analysis for their genetic differentiation.

Key words: *Pleurotus ostreatus*, isolate, strain, RAPD, genetic polymorphism.**Вступ**

Глива устрична або звичайна (*Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kummer.) – один з найбільш популярних і доступних грибів, що культивуються в Україні та країнах СНД. В природі *P. ostreatus* представлена в різній мірі ізольованими, самостійно еволюціонуючими біологічними видами-двійниками, які практично не відрізняються за морфологічними ознаками, хоча, в той же час, не можуть між собою схрещуватися. Часто популяції цього гриба представлені генетично подібними клонами, які виникають завдяки нестатевому розмноженню. Це робить неможливим об'єктивно і достовірно оцінити в природі межі окремих популяцій і навіть видів усередині роду *Pleurotus*. Варто зазначити, що генотипове різноманіття цього гриба вивчено доволі фрагментарно (Штаер, 2006; Штаер и др., 2005), тому дослідження генетичного поліморфізму представляє інтерес як для пізнання

внутрішньовидової структури *P. ostreatus*, так і для можливого в подальшому маркерування (генотипування) високопродуктивних ізолятів гриба.

Для вивчення внутрішньовидового та міжвидового генетичного поліморфізму широко застосовуються ДНК маркери. Одним з найпоширеніших методів аналізу, що дозволяє оцінити генотипові відмінності в межах виду, є RAPD метод (Random Amplified Polymorphic DNA), перевагою якого є технічна простота та швидкість проведення аналізу. Цей метод доволі часто використовують у сучасних молекулярно-генетичних дослідженнях. Тому метою роботи було оцінити генетичне різноманіття ізолятів та одного з штамів *Pleurotus ostreatus* за допомогою RAPD методу.

Об'єкти та методи досліджень

Для проведення аналізу було взято один штам та п'ять ізолятів *P. ostreatus* із колекції кафедри фізіології рослин Донецького національного університету. Для роботи взято природні ізоляти гриба *P. ostreatus*, які було виділено з плодових тіл, зібраних з різних деревинних субстратів: К-99, Р-01, В-99, ВК-2000, С-2000 (табл. 1).

Таблиця 1.

Характеристика досліджуваних зразків *Pleurotus ostreatus*

№	Штам (ізолят)	Місце збору	Природний субстрат (деревина)	Рік збору	Колір шапинки
1	НК-35	з колекції ДонНУ	контроль	–	сірий
2	К-99	Курська обл., с. Коренево, Кореневський р-н	тополя (<i>Populus sp.</i>)	1999	сірий
3	Р-01	м. Макіївка, Донецької обл.	тополя (<i>Populus sp.</i>)	2000	сірий
4	В-99	м. Волноваха, Донецької обл.	горіх волоський <i>Juglans regia L.</i>	1999	сірий
5	ВК-2000	м. Костянтинівка, Донецької обл.	горіх волоський <i>Juglans regia L.</i>	2000	сірий
6	С-2000	м. Слов'янськ, Донецької обл.	осика <i>Populus tremula L.</i>	2000	сірий

В якості контролю використано штам НК-35, який занесено в Державний реєстр сортів України і останнім часом культивується у промисловому масштабі (Державний реєстр сортів, 2009).

Деякі з ізолятів, за попередньо проведеними дослідженнями морфо-біологічних ознак, зокрема врожайності, належать до високопродуктивних (Дорошкевич, 2010). ДНК для аналізу виділяли з міцелію ізолятів за допомогою Gene Elute™ Plant Genomic DNA Miniprep Kit фірми Sigma (США). В подальшому виділену ДНК використовували для проведення полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) з трьома олігонуклеотидними праймерами фірми „Operon” (США): OPP-12 (AAGGGCGAGT), OPP-15 (GGAAGCCAAC) та OPP-17 (TGACCCGCCT). Реакційна суміш для проведення полімеразної ланцюгової реакції об'ємом 25 мкл містила: 50 нг геномної ДНК, 0,2 мкМ праймера, 200 мкМ кожного: dATP, dCTP, dGTP та dTTP, 2,5 мМ MgCl₂, 2,5 одиниці Taq полімерази («Репликон», Росія). Ампліфікацію проводили на ампліфікаторі AB 2700 за наступною програмою: початкова денатурація при 95°C, 5 хв; ампліфікація – 45 циклів (95°C – 1 хв, 35°C – 1 хв, 72°C – 2 хв); кінцеве подовження – 72°C протягом 7 хв. Продукти ампліфікації розділяли за допомогою електрофорезу в 1,5% агарозному гелі з використанням 1× TBE-буфера в присутності етидид броміду. Візуалізацію фрагментів проводили в ультрафіолетовому світлі. Для визначення довжини фрагментів використовували ДНК-маркер (GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder, ready-to-use) фірми Fermentas (Литва).

Отримані електрофоретичні дані переводили у матриці, в яких для кожного праймера вказували кількість смуг (ампліконів або локусів) та наявність (1) або відсутність (0) тієї чи іншої смуги. Кожний RAPD-фрагмент розглядався як окремий генетичний локус (Бронникова и др., 2007). Обробку матриць проводили за допомогою програм TREES (Календарь, 1994).

Результати та обговорення

В результаті проведеного RAPD аналізу *P. ostreatus* було виявлено 13 локусів (ампліконів), 12 (92%) з яких виявились поліморфними. Кількість ампліфікованих фрагментів під час ПЛР з праймером OPP-12 склала 4, з праймером OPP-15 – 7, а з праймером OPP-17 – лише 2. Більшість фрагментів мали довжину в межах 200–2500 п. о. (рис. 1).

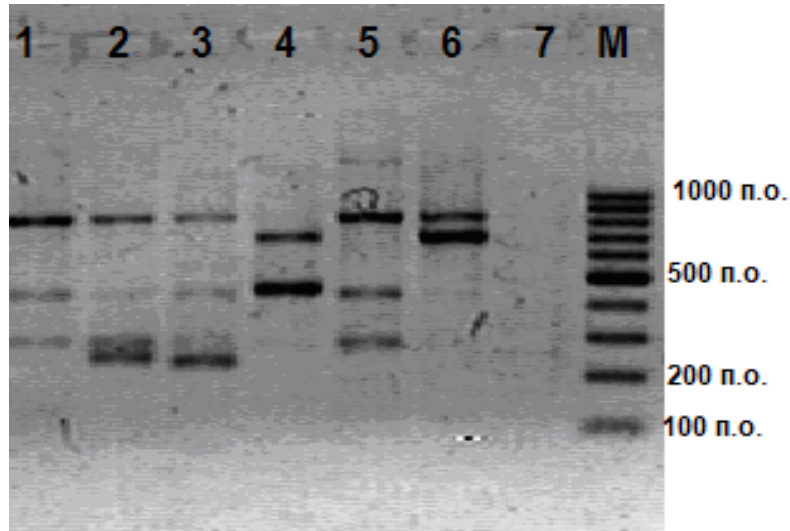


Рис. 1. Результати ампліфікації ДНК досліджених зразків *P. ostreatus* з праймером OPP-15: 1 – В-99; 2 – Р-01; 3 – К-99; 4 – НК-35; 5 – С-2000; 6 – ВК-2000; 7 – вода; М – маркер молекулярної довжини (п.о. – пар основ)

Таблиця 2.

Кількість смуг (ампліконів), які детектуються у досліджуваних зразків за умов проведення аналізу з RAPD праймерами (OPP-12, OPP-15, OPP-17)

Зразки <i>P. ostreatus</i>	Кількість смуг			
	OPP-12	OPP-15	OPP-17	В цілому
В-99	3	3	2	8
Р-01	2	4	0	6
К-99	4	4	1	9
НК-35	1	3	1	5
С-2000	3	3	0	6
ВК-2000	2	2	1	5
Для усіх досліджених зразків	15	19	5	39

Наведені в табл. 2 дані свідчать, що досліджені зразки відрізнялись за кількістю виявлених фрагментів. Значна їх частина були зразок-специфічними. В цілому у всіх досліджених зразків було виявлено 39 фрагментів. Найбільша їх кількість встановлена у зразків К99 та В99, які, до речі, належать до високопродуктивних (Дорошкевич, 2010), а найменша – п'ять – у зразків НК-35 та ВК-2000.

На підставі даних RAPD-аналізу за допомогою програми TREES було розраховано генетичні дистанції Нея-Лі (Nei, Li, 1979) (табл. 3), які в подальшому були використані для проведення кластеризації (UPGMA метод) досліджуваних штамів (рис. 2).

Отримані значення дистанції були близькими до раніше встановлених при дослідженні представників роду *Pleurotus* (Shnyreva, Shtaer, 2006). Виявилось, що найбільш генетично гетерогенними були зразки НК-35 та Р-01, НК-35 та С-2000. В цілому досліджувані зразки доволі чітко різняться між собою, що засвідчує непогані диференціюючі властивості використаних праймерів для RAPD-аналізу. Отримані результати підтверджують можливість використання RAPD-аналізу у якості ефективного експрес-методу виявлення генетичного поліморфізму, що особливо важливо для маловивчених таксономічних груп.

Таблиця 3.

Генетичні дистанції Нея-Лі між дослідженими зразками *P. ostreatus*

Зразки	B-99	P-01	K-99	HK-35	C-2000	BK-2000
B99	***	0,286	0,177	0,539	0,143	0,385
P01	0,286	***	0,333	0,636	0,167	0,455
K99	0,177	0,333	***	0,571	0,200	0,429
HK35	0,539	0,636	0,571	***	0,636	0,400
C2000	0,143	0,167	0,200	0,636	***	0,455
BK2000	0,385	0,455	0,429	0,400	0,455	***

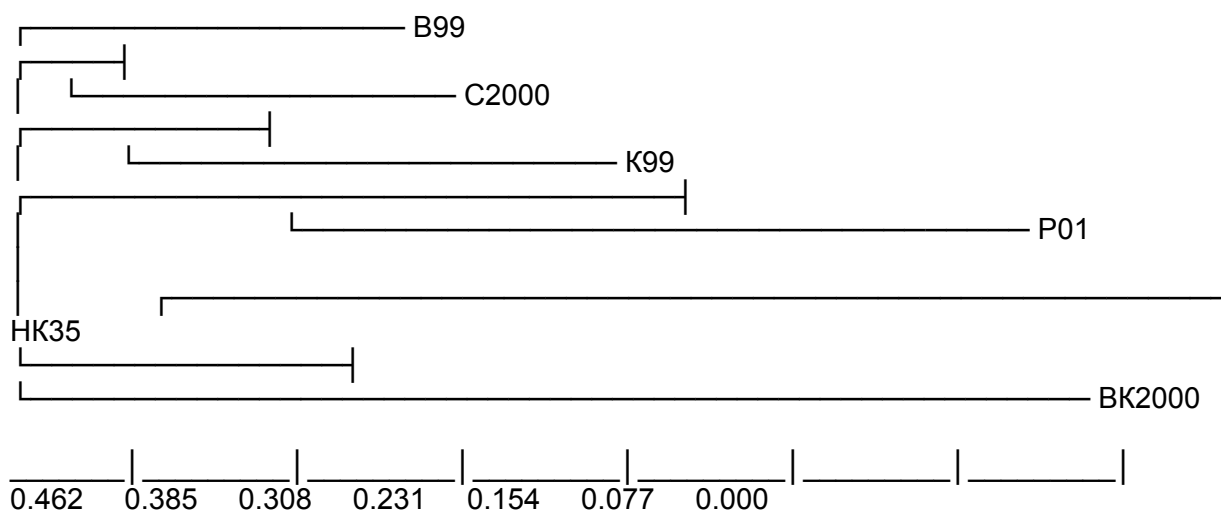


Рис. 2. Дендрограма, побудована за значеннями генетичної дистанції Нея-Лі (Nei, Li, 1979), яка віддзеркалює диференціацію досліджуваних зразків

Кластеризація зразків засвідчила, що найменші генетичні відмінності існують між зразками B-99, C-2000, K-99, P-01, які об'єдналися в одну групу. Зразки НК-35 та BK-2000 об'єдналися в іншу групу (рис. 2). Не було встановлено взаємозв'язку між кластеризацією зразків та їх морфологічними особливостями, наприклад, коефіцієнтом габітусу (Дорошкевич, 2010), урожайністю або географічним розташуванням місць відбору ізолятів.

Таким чином, отримані дані вказують на існування генетичних відмінностей між дослідженими ізолятами *P. ostreatus* і можливість використання RAPD для генетичного маркування

високопродуктивних штамів. Набуття інформації про будову геному *P. ostreatus* дозволить у майбутньому використовувати інші молекулярні маркери, отримані завдяки сіквенуванню ДНК, що дасть можливість спрямувати подальші дослідження на пошук взаємозв'язку між генетичними маркерами та господарсько-цінними ознаками гриба.

Список літератури

- Бронникова С.В., Кокаева З.Г., Гостимский С.А. и др. Анализ ДНК-полиморфизма реликтового вида Урала наперстянки крупноцветковой (*Digitalis grandiflora* Mill.) с помощью RAPD- и ISSR-маркеров // Генетика. – 2007. – Т.43, №5. – С. 653–659.
- Державний реєстр сортів рослин, придатних для поширення в Україні: за станом на 15.04.2009 року / Мін. агр. політики Укр., Держ. служба з охорони прав на сорти рослин. – Офіц. вид. – К.: ТОВ «Алефа», 2009. – С. 192–193.
- Дорошкевич Н.В. Господорсько-біологічна оцінка нових штамів гриба *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kummer). Автореф. дис. ... канд. с.-г. наук. – К., 2010. – 20с.
- Календарь Р.Н. Компьютерная программа для построения эволюционных деревьев на основе электрофореграмм ДНК и белков // Мат-лы конф. «Молекулярно-генетические маркеры и селекция растений». – Киев, 1994. – С. 25–26.
- Штаер О.В. Сравнительный анализ природных популяций *Pleurotus pulmonarius* (Fr.) Quel.: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – М., 2006. – 25с.
- Штаер О.В., Белоконь Ю.С., Белоконь М.М., Шнырева А.В. Сравнительный анализ природных изолятов вида *Pleurotus ostreatus* // Микробиология. – 2005. – Т.74, №2. – С. 231–238.
- Nei M., Li W.H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. – 1979. – Vol.76. – P. 5269–5273.
- Shnyreva A.V., Shtaeer O.V. Differentiation of closely related oyster Fungi *Pleurotus pulmonarius* and *P. ostreatus* by mating and molecular markers // Russian Journal of Genetics. – 2006. – Vol.41, №5. – P. 539–545.

Представлено: С.І.Галкін / Presented by: S.I.Galkin

Рецензент: О.Ю.Акулов / Reviewer: O.Yu.Akulov

Подано до редакції / Received: 01.04.2014