

УДК 579.87:579.256

¹К.Г. Ли*, ¹А.К. Молдагулова, ¹Э.Е. Бекенова,
¹А.К. Кажыбаев,
²М.Ж. Каирова, ¹М.С. Уразова, ¹С.М. Шайхин,
¹К.Х. Алмагамбетов

¹РГП «Республиканская коллекция микроорганизмов» КН МОН РК, г. Астана

¹²РГП «Национальный центр биотехнологии» КН МОН РК, г. Астана²

*e-mail: k.li@rcm.kz

RAPD-фингерпринтинг почвенных микромицетов

Нами получены стабильные RAPD-профили для 7 изолятов почвенных микромицетов амплификацией геномной ДНК с одиночными неспецифическими праймерами. В ПЦР были применены произвольный праймер (декамер AP3), праймер-производное от межгенного спейсерного региона (ТЗВ) и микросателлитный праймер (GTG)₅. Четкие и воспроизводимые профили продуктов амплификации были получены для всех 7 изолятов микромицетов. Количество и размеры ампликонов имели выраженную видовую специфичность. В некоторых случаях наблюдалась и внутривидовая вариабельность. Результаты показывают оправданность применения ДНК-фингерпринтинга для маркирования и быстрой идентификации почвенных микромицетов, а также оценки их стабильности при длительном культивировании.

Ключевые слова: RAPD, праймеры, микромицеты, фингерпринтинг.

К.Г. Ли, А.К. Молдагулова, Э.Е. Бекенова, А.К. Кажыбаев,
 М.Ж. Каирова, М.С. Уразова, С.М. Шайхин,
 К.Х. Алмагамбетов

Топырақ микромицеттерінің RAPD-фингерпринтингі

Біз топырақ микромицеттердің 7 изолятына арналған оңашаланған спецификалық емес праймерлері бар ДНК амплификациялау арқылы тұрақты RAPD-профильдерін алдық. ПЦР ерікті праймер (декамер AP3), генералық спейсер регионнан (ТЗВ) алынған туынды-праймер және микросателитті праймер (GTG)₅ қолданылды. Микромицеттердің барлық 7 изолятына айқын және оқылатын амплификация өнімінің профильдері алынды. Ампликондардың мөлшері және саны түрлік ерекшеліктері айқын көрінді. Кейбір жағдайларда түрішілік әр түрлілік көрінді. Нәтижелер бойынша топырақ микромицеттерді таңбалауға және тез идентификациялауға қолданатын ДНК-фингерпринтинг әдісі және ұзақ уақыт культивирлесе де олардың тұрақтылығын бағалау өзін ақтап шықты.

Түйін сөздер: RAPD, праймерлер, микромицеттер, фингерпринтинг.

K.G. Li, A.K. Moldagulova, E.E. Bekenova, A.K. Kazybaev,
 M.Z. Kairova, M.S. Urazova, S.M. Shajhin,
 K.H. Almagambetov

RAPD-fingerprinting of soil micromycetes

In this study stable RAPD-profiles for 7 soil micromycetes isolates were obtained by amplification of genomic DNA with single nonspecific primers. The arbitrary primer (decamer AP3), primer derived from the intergenic spacer region (ТЗВ) and microsatellite primer (GTG)₅ were applied in PCR. Precise and reproducible profiles of the amplification products were obtained for all seven micromycetes isolates. Species specificity of the amplicons number and size was demonstrated. In some cases, intraspecific variability was observed. The results show justification for the use of DNA fingerprinting for rapid identification and labeling of soil micromycetes, as well as evaluation of their stability during long-term cultivation.

Keywords: RAPD, primers, micromycetes, fingerprinting.

Надежное маркирование потенциально важных и культивируемых с практическими целями микроскопических грибов является насущной задачей, как для стационарных коллекций, так и для временных депозитариев, создаваемых в рамках отдельных исследовательских организаций или проектов.

Паспортизация промышленно-ценных штаммов с помощью методики RAPD-PCR и неспецифических праймеров дает возможность защиты правообладателей бактериальных культур от несанкционированного использования штаммов в аналогичных биотехнологических процессах [1].

Генетическое маркирование энтомопатогенных грибов, выделенных из различных природных биоценозов Казахстана могло бы повысить эффективность скрининга наиболее активных штаммов и способствовать экологическому мониторингу почвенной микобиоты.

В настоящей работе исследовали применимость RAPD-фингерпринтинга для характеристики группы потенциально энтомопатогенных микромицетов, изолированных из почвенного субстрата в селективных условиях и охарактеризованных на морфолого-культуральном, биохимическом и генотипическом уровнях.

Материалы и методы

Изоляты грибов. В качестве объектов исследования использовали 7 изолятов микроскопических грибов, выделенных из почвенных образцов Акмолинской области, которые были идентифицированы ранее по морфолого-биохимическим и генетическим признакам (Табл. 1).

Таблица 1 – Изоляты микромицетов, выделенные из почвенной пробы (Акмолинская область)

Название изолята	Видовое название по ITS-сиквенсу
ПФ1	<i>Penicillium roseopurpureum</i>
ПФ2	не идентифицирован
ПФ3	<i>Penicillium restrictum</i>
ПФ4	<i>Penicillium spp.</i>
ПФ5	<i>Penicillium dipodomycicole</i> или <i>Penicillium chrysogenum</i>
ПФ6	<i>Penicillium chrysogenum</i>
ПФ7	<i>Bionectria ochroleuca</i>

Культивирование грибов проводили по общепринятым методикам [2], с использованием сред Сабуро и Чапека.

Выделение геномной ДНК. Микромицеты культивировали на жидкой среде Сабуро (Sabouraud dextrose broth) в течение 3-5 дней при 25°C при 100 об/мин, а затем путем центрифугирования собирали мицелий, дважды промывали его стерильной дистиллированной водой, лиофилизировали и хранили при –20°C [3]. Лиофилизат растирали в микроцентрифужных пробирках в присутствии жидкого азота, после чего дальнейшую экстракцию ДНК проводили по Cambereri с соавт. [4].

Получение RAPD-профилей с использованием неспецифических праймеров. Для фингерпринтинга использовали праймеры – GTGGTG-GTGGTG, AP3 – TCACGATGCA и T3B – 5'AGGTCGCGGGTTCGAATCC3' [5,6], синтезированные в Лаборатории органического синтеза НЦБ РК. Начальные условия проведения реакций (объем реакционной смеси, концентрации матрицы, праймеров, MgCl₂, температура отжига, количество и тайминг циклов амплификации) использовали согласно литературным данным [5,6]. Оптимальные значения этих параметров подбирали индивидуально, в зависимости от конкретного объекта исследования. Электрофореграммы обрабатывали с помощью программы GelQuest 3.1.7. Кластерный анализ и построение дендрограмм осуществляли с помощью программы ClusterVis 1.8.1.

Результаты и их обсуждение

Чтобы определить пригодность технологии ДНК-фингерпринтинга для видовой идентификации грибных изолятов препарат геномной ДНК каждого из них был использован в реакциях амплификации с каждым из приведенных выше праймеров. Оптимизация условий ПЦР с праймерами заключалась в конкретизации параметров постановки реакций (температура отжига праймеров, количество циклов амплификации, концентрация ионов магния, праймеров и ДНК-матрицы). Были проведены серии экспериментов, в каждой из которой варьировал один из параметров. Серии проводили последовательно, фиксируя в каждом случае оптимальное значение исследуемого фактора.

В конечном итоге были подобраны условия, обеспечивающие максимальный выход продук-

тов амплификации. Ключевое значение имеет температура отжига праймеров (40 для AP3, 52 для ТЗВ и 60 для $(GTG)_5$), а также концентрация самих праймеров (15 pmol/25 µl для AP3 и ТЗВ, и 7 для $(GTG)_5$)

При этом программа амплификации была унифицирована для всех трех праймеров и представляла собой последовательность следующих ступеней: предварительное плавление – 94°C, 5 мин; (94°C, 30 сек – отжиг, 30 сек – 72°C, 1 мин)×35; 72°C – 7 мин;

Каждый из трех использованных праймеров генерировал различные профили продуктов амплификации, варьирующие по расположению полос и их интенсивности (Рис. 1).

В различных изолятах образовывалось от 2 до 9 хорошо различимых и стабильно воспроизводимых ПЦР-продуктов размером от 0,2 до 1,5 т.п.н. Количество и размер ампликонов были характерны для каждого вида.

Рисунок 1 наглядно демонстрирует различия между паттернами, отражающими полиморфизм расположения участков генома грибных изолятов, гомологичных последовательностям использованных праймеров.

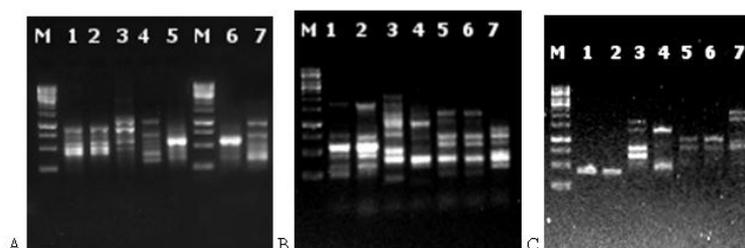
Профили, полученные по праймерам $(GTG)_5$ и AP3 соответствуют данным идентификации изолятов, полученным секвенированием по ITS-региону (Табл. 1). Паттерны ПФ1 и ПФ2, ПФ5 и ПФ6 весьма сходны (однако не абсолютно идентичны) внутри пар. Полное совпадение позиций мажорных и минорных полос дорожек 5 и 6 (А,В,С) позволяют предположить близкое генетическое родство (если не идентичность) изолятов ПФ5 и ПФ6, что подтверждается данными осуществленного ранее генотипирования – изоляты принадлежат к одному виду *Penicilli-*

um chrysogenum. Напротив, определенная ранее принадлежность изолята ПФ1 к виду *Penicillium roseopurpureum* позволяет с высокой степенью вероятности идентифицировать изолят ПФ2 как представителя того же вида, основываясь на полном совпадении ДНК-профилей по двум праймерам – $(GTG)_5$ и АС3 (Рис. 1. 1,2-А,С).

Особый интерес вызывают профили изолятов ПФ1 и ПФ2 по праймеру АС3, представленные единичным ампликоном (Рис. 1. 1,2 – С). Представляется оправданным рассматривать последний как основу для разработки, в перспективе, видоспецифичной системы идентификации *Penicillium roseopurpureum* (SCAR).

Результаты по ТЗВ-профилям, наряду с высоким процентом совпадения ампликонов в парах ПФ1 и ПФ2, ПФ5 и ПФ6 показывают определенный полиморфизм как длин синтезируемых фрагментов, так и их состава, что создает возможность для анализа, в дальнейшем, внутривидовых различий. В этом случае ТЗВ мог бы являться праймером выбора.

Электрофореграммы RAPD-профилей были преобразованы в бинарные матрицы с помощью программы GelQuest 3.1.7. Сформированные числовые данные были подвергнуты кластерному анализу (ClusterVis 1.8.1) с использованием коэффициента Дайса, методом попарного невзвешенного кластерирования с арифметическим усреднением (Unweighted pair-group method using arithmetic averages – UPGMA). Несмотря на малую выборку изолятов кластерный анализ выделяет в них две подгруппы, базирующиеся вокруг идентичных пар – ПФ1 и ПФ2, ПФ5 и ПФ6 независимо от конкретного праймера, генерировавшего ДНК-профили, что согласуется с результатами генотипирования по ITS.



А – RAPD-профиль ПФ1-ПФ7 по $(GTG)_5$; В – RAPD-профиль ПФ1-ПФ7 по ТЗВ; С – RAPD-профиль ПФ1-ПФ7 по AP3; М – ДНК-маркер (250-10000 п.н.)

Рисунок 1 – ДНК-профили микромицетов по неспецифическим праймерам

Воспроизводимость полученных ДНК-профилей является существенной проблемой использования RAPD-PCR для маркирования штаммов и видов [6]. В приведенных экспериментальных работах достаточной считалась двукратная воспроизводимость.

Таким образом, для группы микромицетов, выделенных из почв Акмолинской области, была показана пригодность применения метода RAPD-ПЦР как средства стабильного маркирования на уровне генома, установления филоге-

нетических взаимоотношений и быстрой идентификации. Последнее, однако, может иметь место при условии предварительного накопления достаточной базы данных. Применение одиночных праймеров позволяет дискриминировать межвидовые и внутривидовые различия в ДНК-профилях почвенных микромицетов. Обнаруженные закономерности формирования характерных паттернов (фингерпринтов) дают основания для их использование в дальнейшей идентификации гифомицетов.

Литература

- 1 Ботина С.Г. Молекулярно-биологические подходы к отбору бактериальных культур при создании заквасок для биотехнологии: автореф. ... докт. биол. наук. – Москва, 2011. – 47 с.
- 2 Практикум по микробиологии. / Под ред. А.И. Нетрусова – М.: Академия, 2005. – С.119.
- 3 Fegan M., Manners J.M., Maclean D.J., Irwin J.A., Samuels K.D., Holdom D.G., Li D.P. Random amplified polymorphic DNA markers reveal a high degree of genetic diversity in the entomopathogenic fungus *Metarhizium artisopliae* var. *anisopliae* // J. Gen. Microbiol. – 1993. – Vol. 139. – P. 2075-2081.
- 4 Cambereri E.B., Kinsey J.A. An ultra-fast method of DNA extraction from *Neurospora* // Fungal Genet. Newsl. – 1993. – Vol. 40. – P. 22–23.
- 5 Thanos M., G. Schonian, W. Meyer C., Schweinoch, Y. Graser, T. G. Mitchell, W. Presber, H.-J. Tietz. Rapid identification of *Candida* species by DNA fingerprinting with PCR // J. Clin. Microbiol. – 1996. – Vol. 34. – №3. – P. 615-621.
- 6 Muniz M. de M., Moraes E. Silva Tavares P., Meyer W, Nosanchuk J.D., Zancoppe-Oliveira R.M. Comparison of different DNA-based methods for molecular typing of *Histoplasma capsulatum* // Appl. Environ. Microbiol. – 2010. – Vol.76. – №13. – P. 4438–4447.
- 7 Ramachandran P., Lacher D.W., Pfeiler E.A., Elkins C.A. Development of a tiered multilocus sequence typing scheme for members of the *Lactobacillus acidophilus* complex // Appl. Environ. Microbiol. – 2013. – Vol. 79. – № 23. – P. 7220-7228.