

**ПОДБОР ОПТИМАЛЬНОЙ
МЕТОДИКИ ВЫДЕЛЕНИЯ ДНК
ИЗ МИЦЕЛИЯ ГРИБОВ
РОДА *ALTERNARIA*
ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ ПЦР**

С.А. Рамазанова,

кандидат биологических наук

М.В. Ивебор,

кандидат сельскохозяйственных наук

С.Л. Саукова,

кандидат биологических наук

Н.М. Арасланова,

кандидат сельскохозяйственных наук

Т.С. Антонова,

доктор биологических наук

Россия, 350038, г. Краснодар, ул. им. Филатова, д. 17

Тел.: (861) 275-86-53

E-mail: ramazanov1969@mail.ru

Ключевые слова: *Alternaria* Nees, выделе-
ние ДНК, молекулярные маркеры, ISSR,
ПЦР

Выполнено сравнение разных методик выделе-
ния ДНК из мицелия грибов рода *Alternaria* Nees,
выращенного на разных питательных средах. Ус-
тановлено, что оптимальным является выделение
ДНК при помощи коммерческого набора реагентов
QIAGEN Dnseay Plant MiniKit (Германия). Приго-
ден также модифицированный метод M.E. Zolan
and P.J. Pukkila (1986) с добавлением Al₂O₃ на ста-
дии гомогенизации. Выделены шесть ISSR-
праймеров, иницирующих амплификацию поли-
морфных фрагментов ДНК у видов *Alternaria* Nees,
встречающихся на подсолнечнике в Краснодар-
ском крае. Эти ISSR-локусы могут быть использо-
ваны для изучения меж- и внутривидовой
изменчивости грибов рода *Alternaria*.

UDC 633.854.78:632.4

**Choice of optimal methodology for DNA isolation
from mycelium of *Alternaria species* for PCR**

Ramazanov S.A., candidate of biology

Ivebor M.V., candidate of agriculture

Saukova S.L., candidate of biology

Araslanova N.M., candidate of agriculture

Antonova T.S., doctor of biology

FGBNU VNIIMK

17, Filatova str., Krasnodar, 350038, Russia

Tel.: (861) 275-86-53

ramazanov1969@mail.ru

Key words: *Alternaria* Nees, DNA isolation, molecu-
lar markers, ISSR, PCR

The different methods of DNA isolation from mycelium of fungi of *Alternaria* Nees species cultivated on different mediums were compared. The optimal appeared to be DNA isolation by means of commercial reagents QIAGEN Dnseay Plant MiniKit (Germany). The method of Zolan and Pukkila (1986) modified with application of Al_2O_3 at the stage of homogenization is also suitable. There are isolated six ISSR-primers initiating amplification of polymorphous DNA fragments in *Alternaria* Nees species which are observed on sunflower in Krasnodar region. These ISSR-loci can be used for studying of inter- and intraspecific variability of fungi of *Alternaria* species.

Род *Alternaria* Nees представляет собой большую и разнообразную по биологическим характеристикам группу микромицетов, многие из которых распространены очень широко. В частности, описаны 11 видов этого рода, паразитирующих на подсолнечнике, способных инфицировать как растения, так и семена [1; 2]. Идентификация многих видов *Alternaria* вызывает ряд трудностей, таких как сходство морфологических характеристик разных видов, внутривидовая вариабельность признаков, номенклатурная путаница и отсутствие полноценных русскоязычных определительных ключей, учитывающих современную систематику рода.

В ходе исследования часто не удается определить вид некоторых изолятов по морфологическим признакам. Для достоверной идентификации таких изолятов необходимо применение современных молекулярных методов анализа ДНК гриба. Метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) позволяет преодолеть эти трудности, однако эффективность данного методического приема напрямую зависит от способа выделения ДНК из клеток.

Клеточная стенка грибов состоит из нескольких слоев содержащих белки в форме ковалентно связанных с углеводами гликопротеинов, глюканов и хитина, это и определяет сложности в экстракции ДНК. Из-за недостаточной очистки препаратов ДНК от белков полимеразная цепная реакция может блокироваться полностью или частично, т.е. результаты могут быть невоспроизводимы.

Целью данной работы было оптимизировать методику выделения ДНК из мицелия грибов рода *Alternaria*, выращенного на разных питательных средах, и выявить стабильный, воспроизводимый полиморфизм амплифицированных фрагментов, пригодных для создания системы молекулярных маркеров и идентификации разных видов патогена, встречающихся на подсолнечнике в Краснодарском крае.

Материал и методы. Объектом исследований послужили 30 образцов мицелия грибов рода *Alternaria*, выделенных из листьев, стеблей и семян подсолнечника. С целью изучения эффективности различных методов выделения ДНК гриба для проведения ПЦР применяли сравнительный анализ трех способов выделения: наборы QIAGEN Dnseay Plant MiniKit (Германия), Diamond DNA Plant Kit D (Россия), метод основанный на использовании лизирующего буфера, содержащего гексадецилтриметиламмоний бромид (СТАВ) [3] с добавлением оксида алюминия и без него (табл. 1). В качестве материала для выделения ДНК использовали мицелий, выращенный на двух разных питательных средах: а) в пластиковых чашках Петри на картофельно-морковном агаре (КМА) с последующим соскабливанием; б) на жидкой среде Чапека с последующим фильтрованием.

Концентрацию ДНК в полученном препарате определяли визуально по интенсивности свечения пробы объемом 10 мкл в ультрафиолетовом свете в 1%-ном агарозном геле с добавлением 2 мкл бромистого этидия. Электрофорез проводили при напряжении 100–120 V в течение 40 мин.

Для ПЦР анализа применяли 12 ISSR-праймеров (табл. 2) [10].

Полимеразную цепную реакцию выполняли в реакционной смеси (25 мкл) следующего состава: 67 mM Трис-HCl (pH 8,8); 16,6 mM сульфата аммония; 1,5–3,0 mM $MgCl_2$; 0,01 % Tween 20; по 0,2 mM дезоксирибонуклеозидфосфатов; по 10 пМ праймеров; 10 нг матричной ДНК и 1 ед. рекомбинантной термоста-

бильной ДНК-полимеразы («Сибэнзим», Россия). Реакции проводили в термоциклере S1000™ (BioRad, США) при следующих температурных режимах: начальная денатурация при 94 °С в течение 2 мин, далее 35 циклов с последовательной сменой температур: денатурация при 94 °С в течение 60 сек, отжиг праймера при N °С – 60 сек, элонгация при 72 °С – 80 сек, где N – температура отжига каждого праймера – представлена в таблице 2.

Электрофорез продуктов амплификации проводили в геле, содержащем 2 % агарозы и TAE-буфер, с использованием камеры для горизонтального электрофореза SE-2 (Хеликон, Россия). Гели окрашивали бромистым этидием. Для визуализации и документирования результатов электрофореза применяли систему цифровой документации видеоизображения BIO-PRINT (Vilber Lourmat, Франция).

Таблица 1

Методы, использованные для выделения ДНК из мицелия грибов рода *Alternaria*

№ п/п	Вид	Метод экстракции ДНК	Питательная среда
1	<i>A. alternata</i>	QIAGEN Dnseay Plant MiniKit (Германия)	ср. Чапека
2	<i>A. alternata</i>	Diamond DNA Plant Kit D (Россия)	-//-
3	<i>A. tenuissima</i>	QIAGEN Dnseay Plant MiniKit	-//-
4	<i>A. tenuissima</i>	Diamond DNA Plant Kit D	-//-
5	<i>A. tenuissima</i>	QIAGEN Dnseay Plant MiniKit	-//-
6	<i>A. tenuissima</i>	Diamond DNA Plant Kit D	-//-
7	<i>A. helianthifaciens</i>	QIAGEN Dnseay Plant MiniKit	-//-
8	<i>A. helianthifaciens</i>	Diamond DNA Plant Kit D	-//-
9	<i>A. tenuissima</i>	QIAGEN Dnseay Plant MiniKit	-//-
10	<i>A. tenuissima</i>	Diamond DNA Plant Kit D	-//-
11	<i>A. infectoia</i>	Diamond DNA Plant Kit D	-//-
12	<i>A. infectoia</i>	Diamond DNA Plant Kit D	-//-
13	<i>A. tenuissima</i>	Diamond DNA Plant Kit D	-//-
14	<i>A. tenuissima</i>	Diamond DNA Plant Kit D	-//-
15	<i>Ulocladium sp</i>	Diamond DNA Plant Kit D	-//-
16	<i>Ulocladium sp</i>	Diamond DNA Plant Kit D	-//-
17	<i>A. tenuissima</i>	CTAB	КМА*
18	<i>Stemphillium</i>	CTAB	-//-
19	<i>A. tenuissima</i>	CTAB	-//-
20	<i>Stemphillium</i>	CTAB	-//-
21	<i>A. tenuissima</i>	CTAB, Al ₂ O ₃	-//-
22	<i>Alternaria sp</i>	CTAB, Al ₂ O ₃	-//-
23	<i>Alternaria sp</i>	CTAB, A ₂ O ₃	-//-
24	<i>Alternaria sp</i>	CTAB, Al ₂ O ₃	-//-
25	<i>A. infectoia</i>	CTAB, Al ₂ O ₃	-//-
26	<i>A. tenuissima</i>	CTAB, Al ₂ O ₃	-//-
27	<i>A. infectoia</i>	CTAB, A ₂ O ₃	ср. Чапека
28	<i>A. arborescens</i>	CTAB, Al ₂ O ₃	-//-
29	<i>Alternaria sp</i>	CTAB, A ₂ O ₃	-//-
30	<i>A. tenuissima</i>	CTAB, Al ₂ O ₃	-//-

* – КМА картофельно-морковный агар

Результаты и обсуждение. Для исследования по подбору оптимальной методики экстракции ДНК из мицелия гриба были выбраны два коммерческих набора реактивов: QIAGEN Dnseay Plant MiniKit (Германия), предназначенный для выделения ДНК из растений, общепризнанный «золотым стандартом» в области пробоподготовки, и Diamond DNA Plant Kit D (Россия), созданный для выделения ДНК из засушенных растений, семян и грибов. Не удалось получить качественные препараты ДНК с использованием набора Diamond, несмотря на входящую в состав его методики обработку ферментом протеиназой К, рекомендуемой многими авторами [4–9]. Полученная ДНК не гибридизовалась ни с одним из праймеров и в результате не удалось получить продукты реакции амплификации. На рисунке 1 представлены фореграммы с праймером GAA6 продуктов амплификации ДНК, выделенной с помощью наборов QIAGEN и Diamond. В случае экстракции с использованием набора Diamond продукты амплификации не были получены так же ни с одним из изученного набора праймеров.

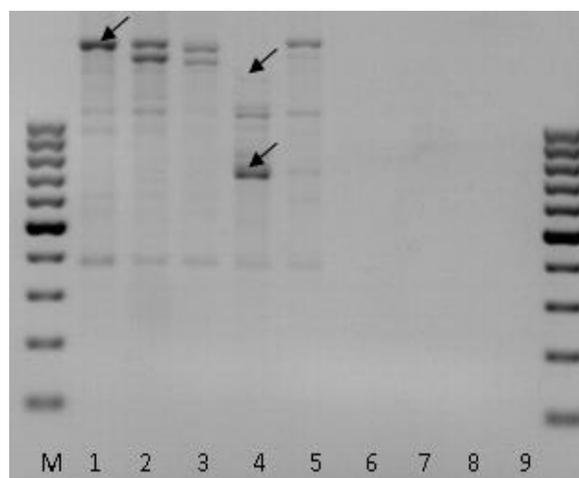


Рисунок 1 – Электрофоретические спектры продуктов амплификации ДНК грибов рода *Alternaria* с праймером GAA6 при употреблении разных методик выделения: 1–5 – QIAGEN; 6–9 – Diamond. Стрелками указаны полиморфные фрагменты ДНК. М – маркер молекулярного веса; 1 – *A. Alternata*; 2, 3, 5 – *A. tenuissima*; 4 – *A. Helianthifaciens*

Из четырех апробированных вариантов экстракции ДНК лучший результат удалось получить при использовании набора QIAGEN. На рисунке 2 представлена фореграмма продуктов амплификации ДНК, выделенной с набором QIAGEN и методом СТАВ без использования оксида алюминия. Во втором варианте качество полученной ДНК было хуже, что позволило получить продукты амплификации, но при этом не было выявлено полиморфных фрагментов.

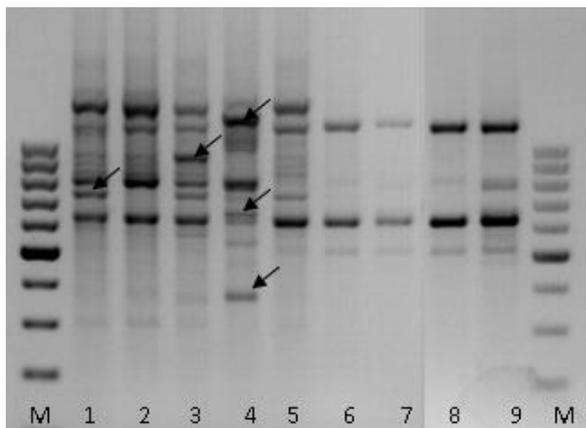


Рисунок 2 – Электрофоретические спектры продуктов амплификации ДНК грибов рода *Alternaria* с праймером GACA4 при употреблении разных методик выделения: 1–5 – QIAGEN; 6–9 СТАВ. Стрелками указаны полиморфные фрагменты ДНК. М – маркер молекулярного веса; 1 – *A. Alternata*; 2, 3, 5 – *A. tenuissima*; 4 – *A. helianthiiinficiens*

Препараты ДНК хорошего качества удалось получить и при выделении ДНК методом СТАВ, но с добавлением оксида алюминия. Выделенная таким способом ДНК производила продукты реакции с ISSR-праймерами, и при этом были выявлены полиморфные фрагменты. Не имело значения, как выращен мицелий, – на твердых, агаризованных, или жидких средах. Таким образом, лучшего качества препараты ДНК удалось получить при использовании двух способов её выделения и очистки: с применением коммерческого набора для экстракции ДНК – QIAGEN, и с использованием СТАВ с добавлением

оксида алюминия. Причем, учитывая стоимость комплекта необходимых буферов и реагентов QIAGEN, предпочтительнее применять второй способ.

Выделенные всеми четырьмя способами образцы ДНК гриба были апробированы с некоторыми универсальными праймерами, разработанными для наиболее распространенных видов *Alternaria*. Проведенные реакции амплификации показали, что ДНК, экстрагированная с применением набора Diamond, не производила продуктов реакции с ними и в дальнейшем ПЦР с этими образцами ДНК не проводилась. Матричная ДНК, полученная остальными методами, хорошо гибридизовалась со специфичными праймерами, и были получены четкие, хорошо воспроизводимые фракции, представленные на рисунке 3.

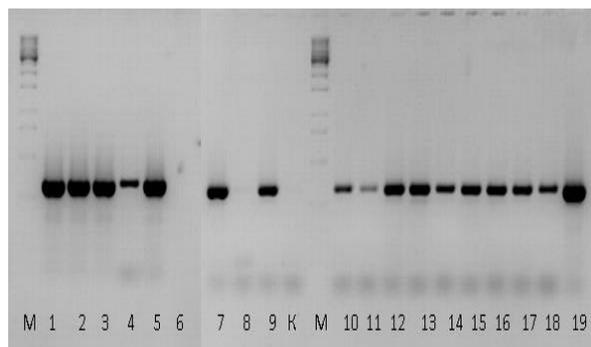


Рисунок 3 – Электрофоретические спектры продуктов амплификации ДНК грибов рода *Alternaria* с парой праймеров AAR3, AAF2 при употреблении разных методик выделения: 1–5 – QIAGEN; 6–9 СТАВ; 10–9 – СТАВ с Al₂O₃. М – маркер молекулярного веса. К – отрицательный контроль

Для выявления молекулярно-генетического полиморфизма у разных видов *Alternaria* был проведен скрининг 12 ISSR-локусов (табл. 2). Такие простые повторяющиеся последовательности распределены по всему геному эукариот и успешно используются для выявления различий между разными видами микромицетов [10; 11; 12]. Как описано выше, в реакциях амплификации с этими праймерами использовалась матричная ДНК,

выделенная двумя способами: набором QIAGEN и с использованием СТАВ с Al_2O_3 . Как показано в таблице 2, из 12 проанализированных ISSR-праймеров шесть давали продукты амплификации, причем во всех случаях были выявлены полиморфные фракции у образцов ДНК разных видов гриба.

Таблица 2

Характеристика ISSR-локусов, использованных для получения полиморфных фрагментов ДНК, у грибов рода *Alternaria*, паразитирующих на подсолнечнике

Праймер	Последовательность праймеров 5' – 3'	Температура отжига	Наличие или отсутствие полиморфизма
CA8	CAC ACA CAC ACA CAC A	53	+
CAC5	CAC CAC CAC CAC CAC	53	Нет отжига
CT8	CTC TCT CTC TCT CTC T	50	Нет отжига
GAA6	GAA GAA GAA GAA GAA GAA	53	+
GACA4	GAC AGA CAG ACA GAC A	53	+
GATA4	GAT AGA TAG ATA GAT A	53	Нет отжига
GGAT4	GGA TGG ATG GAT GGA T	53	+
GTG5	GTC GTC GTC GTC GTC	50	+
TCC5	TCC TCC TCC TCC TCC	53	Нет отжига
TG10	TGT GTG TGT GTG TGT GTG TG	53	Нет отжига
T3B	AGG TGG GGG GTT GGA ATC C	53	Нет отжига
M13	GAG GGT GGN GGN TCT	53	+

В ходе эксперимента по ISSR-локусам GAA6 и GACA4 были выявлены полиморфные фракции ДНК у изолята *A. helianthiinficiens*. На рисунках 1 и 2 эти фракции показаны стрелками на дорожке под номером 4. По локусу GAA6 выявлено две полиморфных фракции, которых нет у изолятов *A. alternata* (дорожка 1) и *A. tenuissima* (дорожки 2, 3, 5) (рис. 1). А по локусу GACA4 выявлено три фракции, отличающие этот изолят от остальных (рис. 2). Однако при проведении ПЦР с несколькими образцами ДНК одного вида *Alternaria* так же обнаружены полиморфные фракции. Например, у образцов *A. tenuissima*, представленных на рисунках 1 и 2 (дорожки 2, 3, 5). Несмотря на это, изученные ISSR-локусы пригодны для выявления меж- и внутривидовых различий у грибов рода *Alternaria*.

Заключение. Таким образом, для грибов рода *Alternaria*, распространённых на подсолнечнике, наиболее подходящим способом выделения ДНК являются методики QIAGEN Dnseay Plant MiniKit

(Германия) и СТАВ с добавлением Al_2O_3 на стадии гомогенизации.

Выявлены шесть ISSR-праймеров, инициирующих амплификацию полиморфных фрагментов ДНК у видов *Alternaria* Nees, встречающейся на подсолнечнике в Краснодарском крае.

Исследования выполнены при финансовой поддержке РФФИ и Администрации Краснодарского края, грант №13-04-96586.

Список литературы

1. Ганнибал Ф.Б. Видовой состав, систематика и география возбудителей альтернариозов подсолнечника в России // Вестник защиты растений. – 2011. – № 1. – С. 13–19.
2. Ивёбор М.В., Антонова Т.С., Саукова С.Л. К вопросу о возбудителях альтернариоза подсолнечника // Масличные культуры: Науч.-тех. бюл. ВНИИМК. – 2013. – Вып. 1 (153–154). – С. 90–100.
3. Zolan M.E., Pukkila P.J. Inheritance of DNA methylation in *Corpinus cinereous* // Mol. Cell Biol. – 1986. – Т. 6. – № 1. – Р. 195–200.
4. Ганнибал Ф.Б. Мониторинг альтернариозов сельскохозяйственных культур и идентификация грибов рода *Alternaria*. – СПб: ВИЗР, 2011. – 71 с.
5. Chen X.M., Line R.F., Leung H. Relationship between virulence variation and DNA polymorphism in *Puccinia striiformis* // Phytopathology. – 1993. – V. 83. – Р. 1489–1497.
6. Тютерев С.Л., Евстигнеева Т.А. Биохимические методы исследования индуцированной болезнеустойчивости растений. – СПб: ВИЗР, 2001. – 67 с.
7. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование. – М.: Мир, 1984. – 480 с.
8. Crowhurst R.N., Hawthorne B.T., Rikkerink E.H., Templeton M.D. Differentiation of *Fusarium solani* f. sp. *cucurbitae* races 1 and 2 by random amplification of polymorphic DNA. – Curr. Genet. – 1991. – № 20 (5) – Р. 391–396.
9. Goodwin P.H., Annis S.L. Rapid identification of genetic variation and Pathotype of *Leptosphaeria maculans* by random amplification of polymorphic DNA assay // Applied Environmental Microbiology. – 1991. – V. 57 (9). – Р. 2482–2486.
10. Intelmann F., Spring O. Analysis of total DNA by minisatellite and simple-sequence repeat primers for the use of population studies in *Plasmopara halstedii* // Can. J. Microbiol. – 2002. – V. 48. – Р. 555–559.
11. Thanos M., Schönian G., Schweynoch W., Gräser C. [et al.]. Rapid identification of *Candida* Species by DNA fingerprinting with PCR // J. Clin. Microbiol. – 1996. – V. 34 (3). – Р. 615–621.

12. Zézé A., Sulistyowat E., Ophel-Keller K., Barker S. and Smith S. Intersporal genetic variation of *Gigaspora margarita*, a vesicular arbuscular mycorrhizal fungus, revealed by M13 minisatellite-primed // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1997. – V. 63 (2). – P. 676–678.

References

1. Gannibal, F.B. Vidovoy sostav, sistematika i geografiya vzbuditeley alternariozov podsolnechnika v Rossii / F. B. Gannibal // *Vestnik zaschiti rasteniy.* – 2011. – № 1. – S. 13–19.

2. Iwebor M.V. K voprosu o vzbuditelyah alternarioza podsolnechnika / M.V. Iwebor, T.S. Antonova, S.L. Saukova // *Maslichnie kul'turi: Nauch.-teh. byul. VNIIMK* – 2013. – Vip. 1 (153–154). – S. 90–100.

3. Zolan, M.E., Inheritance of DNA methylation in *Corpinus cinereous* / M.E. Zolan, P.J. Pukkila // *Mol. Cell Biol.* – 1986. – T. 6. – № 1. – P. 195–200.

4. Gannibal F.B. Monitoring alternariozov sel'skohozyaystvennyh kul'tur i identifikatsiya gribov roda *Alternaria* / F. B. Gannibal // *SPb: VIZR*, 2011. – 71 s.

5. Chen, X. M. Relationship between virulence variation and DNA polymorphism in *Puccini's striiformis* / X.M. Chen, R.F. Line, and H. Leung // *Phytopathology.* – 1993. – V. 83. – P. 1489–1497.

6. Tyuterev, S.L. Biohimicheskie metody issledovaniya indutsirovannoy bolezneustoychivosti rasteniy / S.L. Tyuterev, T.A. Evstigneeva // *SPb: VIZR*, 2001. – 67 s.

7. Maniatis, T. Moleculyarnoe klonirovanie / T. Maniatis, E. Fritch, Dg. Sembruk // *M.: Mir*, 1984. – 480 s.

8. Crowhurst, R.N. Differentiation of *Fusarium solani* f. sp. *cucurbitae* races 1 and 2 by random amplification of polymorphic DNA / R.N. Crowhurst, B.T. Hawthorne, E.H. Rikkerink, M.D. Templeton // *Curr. Genet.* – 1991. – № 20 (5). – P. 391–396.

9. Goodwin, P.H. Rapid identification of genetic variation and Pathotype of *Leptosphaeria maculans* by random amplification of polymorphic DNA assay / P.H. Goodwin, S.L. Annis // *Applied Environmental Microbiology.* – 1991. – V. 57 (9). – P. 2482–2486.

10. Intelmann, F. Analysis of total DNA by minisatellite and simple-sequence repeat primers for the use of population studies in *Plasmopara halstedii* / F. Intelmann, O. Spring // *Can. J. Microbiol.* – 2002. – V. 48. – P. 555–559.

11. Thanos, M. Rapid identification of *Candida* Species by DNA fingerprinting with PCR / M. Thanos, G. Schönian, W. Schweynoch, C. Gräser [et al.] // *J. Clin. Microbiol.* – 1996. – V. 34 (3). – P. 615–621.