

BIOOPEN



I Ogólnopolska Konferencja

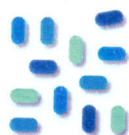
Doktorantów Nauk o Życiu

KSIĄŻKA ABSTRAKTÓW

20-22 kwietnia 2015 r.

Łódź

Uniwersytet Łódzki
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska



**WYDZIAŁ
BIOLOGII
i OCHRONY
ŚRODOWISKA**



Uniwersytet
ŁÓDZKI

IDENTYFIKACJA GRZYBÓW TERMOOPORNYCH WYIZOLOWANYCH Z GLEBY I TRUSKAWEK NA PODSTAWIE METOD KLASYCZNYCH I MOLEKULARNYCH

Bilińska-Wielgus N^{1*}, Frac M^{1*}, Gryta A¹, Oszust K¹, Irzykowski W², Piotrkowska M³, Jędrzycka M²

1) Instytut Agrofizyki im. B. Dobrzańskiego Polskiej Akademii Nauk, ul. Doświadczalna 4, 20-290 Lublin,

2) Instytut Genetyki Roślin Polskiej Akademii Nauk, ul. Strzeszyńska 34, 60-479 Poznań

3) Instytut Technologii Fermentacji i Mikrobiologii, Politechnika Łódzka, ul. Wólczańska 171/173, 90-924 Łódź

e-mail autora do korespondencji*: n.bilinska@ipan.lublin.pl, m.frac@ipan.lublin.pl

Do klasycznych metod identyfikacji mikrogrzybów zaliczamy techniki obserwacji mikro- i makroskopowych, które na podstawie elementów strukturalnych grzybni i sposobu rozmnażania pozwalają na zakwalifikowanie izolatów do określonego rodzaju bądź gatunku. Innym sposobem identyfikacji są metody oparte o reakcje biochemiczne, wśród których system Biolog FF MicroPlate opiera się na zdolności grzybów do utylizacji źródeł węgla, tworząc „metaboliczny odcisk palca” danego gatunku. Metody te niejednokrotnie są niewystarczające i mało precyzyjne. Alternatywą są metody biologii molekularnej, polegające na zastosowaniu łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR) z użyciem specyficznych starterów. Często w tym celu wykorzystywane są obszary, które cechują się wysoką homologią, takie jak obszary w obrębie genów kodujących rybosomalny RNA (rDNA).

W skład eukariotycznego operonu *rrn* wchodzi kolejno ułożone geny: 18S, 5.8S, 28S, wśród których 18S rDNA należy do małej podjednostki rybosomu (SSU), a pozostałe do dużej podjednostki rybosomu (LSU). Sekwencje 18S rDNA i 5.8S rDNA rozdzielają sekwencje niekodujące ITS1, natomiast pomiędzy 5.8S a 28S znajduje się sekwencja ITS2. W diagnostyce grzybów często wykorzystywane są regiony ITS (internal transcribed spacer), a także D2 LSU, których zapis jest swoisty dla rodzaju lub gatunku.

Celem przeprowadzonych badań była identyfikacja szczepów termoopornych grzybów strzępkowych wyizolowanych z gleby (G153/14, G168/14) i truskawek (G126/14, G131/14) z wykorzystaniem następujących metod: oceny cech makro- i mikroskopowych, oceny profilu metabolicznego, sekwencjonowania fragmentu kodującego dużą podjednostkę rybosomu D2 LSU oraz sekwencjonowania niekodującego odcinka międzygenowego ITS. Grzyby termooporne wyizolowano z gleby i owoców, poddając próbki szokowi cieplnemu (85°C) przez 30 minut.

Na podstawie obserwacji makro- i mikroskopowych, obejmujących ocenę elementów morfologicznych grzybni (worków z zarodnikami workowymi i zarodników oraz konidioforów i konidiów) wszystkie szczepy zostały przyporządkowane do rodzaju *Neosartorya*. Na podstawie oceny uzdolnień metabolicznych na płytkach FF Biolog oraz porównania uzyskanego „fingerprintu” z bazą danych nie stwierdzono jednoznacznej identyfikacji gatunkowej, jednak profil metaboliczny wszystkich szczepów był najbardziej zbliżony do znajdującego się w bazie danych gatunku *N. fischeri*. Analiza MicroSeq (D2 LSU rDNA) wykazała, że badane szczepy należą do gatunku *N. fischeri*, natomiast na podstawie sekwencji ITS szczep G168/14 został zidentyfikowany jako *N. laciniosa*, a G126/14, G131/14 i G153/14 jako *N. glabra*. Przeprowadzone badania wykazały zróżnicowanie sekwencji w obrębie badanych genów. Na podstawie analizy D2 potwierdzono przynależność do rodzaju, ale gatunek nie był właściwie zidentyfikowany. Dopiero sekwencjonowanie fragmentu ITS przysłużyło się do prawidłowej identyfikacji gatunkowej. Badania wykazały, że klasyczne metody makro i mikroskopowe oraz metaboliczne są ważnym narzędziem w pierwszej skriningowej identyfikacji izolatów środowiskowych, ze względu na znacznie niższe koszty badań w porównaniu do metod biologii molekularnej.

Badania finansowane przez Narodowe Centrum Nauki (Polska), projekt: DEC-2012/07/D/NZ9/03357

 NARODOWE CENTRUM NAUKI

SONATA 4