

ISSN 2224-5308

ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ
ҰЛТТЫҚ ҒЫЛЫМ АКАДЕМИЯСЫНЫҢ

Х А Б А Р Л А Р Ы

ИЗВЕСТИЯ

НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК
РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН

NEWS

OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES
OF THE REPUBLIC OF KAZAKHSTAN

**БИОЛОГИЯ ЖӘНЕ МЕДИЦИНА
СЕРИЯСЫ**



**СЕРИЯ
БИОЛОГИЧЕСКАЯ И МЕДИЦИНСКАЯ**



**SERIES
OF BIOLOGICAL AND MEDICAL**

3 (309)

**МАМЫР – МАУСЫМ 2015 ж.
МАЙ – ИЮНЬ 2015 г.
MAY – JUNE 2015**

**1963 ЖЫЛДЫҢ ҚАҢТАР АЙЫНАН ШЫҒА БАСТАҒАН
ИЗДАЕТСЯ С ЯНВАРЯ 1963 ГОДА
PUBLISHED SINCE JANUARY 1963**

**ЖЫЛЫНА 6 РЕТ ШЫҒАДЫ
ВЫХОДИТ 6 РАЗ В ГОД
PUBLISHED 6 TIMES A YEAR**

**АЛМАТЫ, ҚР ҰҒА
АЛМАТЫ, НАН РК
ALMATY, NAS RK**

Б а с р е д а к т о р

ҚР ҰҒА академигі

Ж. А. Арзықұлов

Р е д а к ц и я а л қ а с ы:

биол. ғ. докторы, проф., ҚР ҰҒА академигі **Айтхожина Н.А.**; биол. ғ. докторы, проф., ҚР ҰҒА академигі **Байгулин И.О.** (бас редактордың орынбасары); биол. ғ. докторы, проф., ҚР ҰҒА академигі **Берсімбаев Р.И.**; биол. ғ. докторы, проф., ҚР ҰҒА академигі **Бишімбаева Н.К.**; мед. ғ. докторы, проф., ҚР ҰҒА академигі **Күзденбаева Р.С.**; мед. ғ. докторы, проф., ҚР ҰҒА академигі **Рахышев А.Р.**; мед. ғ. докторы, проф., ҚР ҰҒА корр. мүшесі **Ақшолақов С.К.**; мед. ғ. докторы, проф., ҚР ҰҒА корр. мүшесі **Алшынбаев М.К.**; биол. ғ. докторы, проф., ҚР ҰҒА корр. мүшесі **Березин В.Э.**; мед. ғ. докторы, проф., ҚР ҰҒА корр. мүшесі **Ботабекова Т.К.**; биол. ғ. докторы, проф., ҚР ҰҒА корр. мүшесі **Жамбакин К.Ж.**; мед. ғ. докторы, проф., ҚР ҰҒА корр. мүшесі **Қайдарова Д.Р.**; мед. ғ. докторы, проф., ҚР ҰҒА корр. мүшесі **Локшин В.Н.**; биол. ғ. докторы, проф., ҚР ҰҒА корр. мүшесі **Огарь Н.П.**; мед. ғ. докторы, проф., ҚР ҰҒА корр. мүшесі **Рахыпбеков Т.К.**

Р е д а к ц и я к е ң е с і:

Абжанов Архат (Бостон, АҚШ); **Абелев С.К.** (Мәскеу, Ресей); **Лось Д.А.** (Мәскеу, Ресей); **Бруно Луненфелд** (Израиль); доктор, проф. **Харун Парлар** (Мюнхен, Германия); философия докторы, проф. **Стефано Перни** (Кардиф, Ұлыбритания); **Саул Пуртон** (Лондон, Ұлыбритания); **Сапарбаев Мурат** (Париж, Франция); **Сарбассов Дос** (Хьюстон, АҚШ); доктор, проф. **Гао Энджун** (Шэньян, ҚХР)

Главный редактор

академик НАН РК

Ж. А. Арзыкулов

Редакционная коллегия:

доктор биол. наук, проф., академик НАН РК **Н.А. Айтхожина**; доктор биол. наук, проф., академик НАН РК **И.О. Байтулин** (заместитель главного редактора); доктор биол. наук, проф., академик НАН РК **Р.И. Берсимбаев**; доктор биол. наук, проф., академик НАН РК **Н.К. Бишимбаева**; доктор мед. наук, проф., академик НАН РК **Р.С. Кузденбаева**; доктор мед. наук, проф., академик НАН РК **А.Р. Рахишев**, доктор мед. наук, проф., чл.-корр. НАН РК **С.К. Акшулаков**, доктор мед. наук, проф., чл.-корр. НАН РК **М.К. Алчинбаев**; доктор биол. наук, проф., чл.-корр. НАН РК **В.Э. Березин**; доктор мед. наук, проф., чл.-корр. НАН РК **Т.К. Ботабекова**; доктор биол. наук, проф., чл.-корр. НАН РК **К.Ж. Жамбакин**; доктор мед. наук, проф., чл.-корр. НАН РК **Д.Р. Кайдарова**; доктор мед. наук, проф., чл.-корр. НАН РК **В.Н. Локшин**; доктор биол. наук, проф., чл.-корр. НАН РК **Н.П. Огарь**; доктор мед. наук, проф., чл.-корр. НАН РК **Т.К. Рахыпбеков**

Редакционный совет:

Абжанов Архат (Бостон, США); **С.К. Абелев** (Москва, Россия); **Д.А. Лось** (Москва, Россия); **Бруно Луненфельд** (Израиль); доктор, проф. **Харун Парлар** (Мюнхен, Германия); доктор философии, проф. **Стефано Перни** (Кардиф, Великобритания); **Саул Пуртон** (Лондон, Великобритания); **Сапарбаев Мурат** (Париж, Франция); **Сарбассов Дос** (Хьюстон, США); доктор, проф. **Гао Энджун** (Шэньян, КНР)

«Известия НАН РК. Серия биологическая и медицинская». ISSN 2224-5308

Собственник: РОО «Национальная академия наук Республики Казахстан» (г. Алматы)

Свидетельство о постановке на учет периодического печатного издания в Комитете информации и архивов Министерства культуры и информации Республики Казахстан №5546-Ж, выданное 01.06.2006 г.

Периодичность: 6 раз в год

Тираж: 300 экземпляров

Адрес редакции: 050010, г. Алматы, ул. Шевченко, 28, ком. 219, 220, тел. 272-13-19, 272-13-18,
www.nauka-nanrk.kz / biological-medical.kz

© Национальная академия наук Республики Казахстан, 2015

Адрес типографии: ИП «Аруна», г. Алматы, ул. Муратбаева, 75

Editor in chief

Zh.A. Arzykulov,
academician of NAS RK

Editorial board:

N.A. Aitkhozhina, dr. biol. sc., prof., academician of NAS RK; **I.O. Baitulin**, dr. biol. sc., prof., academician of NAS RK (deputy editor); **R.I. Bersimbayev**, dr. biol. sc., prof., academician of NAS RK; **N.K. Bishimbayeva**, dr. biol. sc., prof., academician of NAS RK; **R.S. Kuzdenbayeva**, dr. med. sc., prof., academician of NAS RK; **A.R. Rakhishev**, dr. med. sc., prof., academician of NAS RK; **S.K. Akshulakov**, dr. med. sc., prof., corr. member of NAS RK; **M.K. Alchinbayev**, dr. med. sc., prof., corr. member of NAS RK; **V.E. Berezin**, dr. biol. sc., prof., corr. member of NAS RK; **T.K. Botabekova**, dr. med. sc., prof., corr. member of NAS RK; **K.Zh. Zhambakin**, dr. biol. sc., prof., corr. member of NAS RK; **D.R. Kaidarova**, dr. med. sc., prof., corr. member of NAS RK; **V.N. Lokshin**, dr. med. sc., prof., corr. member of NAS RK; **N.P. Ogar**, dr. biol. sc., prof., corr. member of NAS RK; **T.K. Rakhypbekov**, dr. med. sc., prof., corr. member of NAS RK

Editorial staff:

Abzhanov Arkhat (Boston, USA); **S.K. Abelev** (Moscow, Russia); **D.A. Los** (Moscow, Russia); **Bruno Lunenfeld** (Israel); **Harun Parlar**, dr., prof. (Munich, Germany); **Stefano Perni**, dr. phylos., prof. (Cardiff, UK); **Saparbayev Murat** (Paris, France); **Saul Purton** (London, UK); **Sarbassov Dos** (Houston, USA); **Gao Endzhun**, dr., prof. (Shenyang, China)

News of the National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan. Series of biology and medicine.
ISSN 2224-5308

Owner: RPA "National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan" (Almaty)

The certificate of registration of a periodic printed publication in the Committee of information and archives of the Ministry of culture and information of the Republic of Kazakhstan N 5546-Ж, issued 01.06.2006

Periodicity: 6 times a year

Circulation: 300 copies

Editorial address: 28, Shevchenko str., of. 219, 220, Almaty, 050010, tel. 272-13-19, 272-13-18,
<http://nauka-nanrk.kz/> / biological-medical.kz

© National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan, 2015

Address of printing house: ST "Aruna", 75, Muratbayev str, Almaty

NEWS

OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE REPUBLIC OF KAZAKHSTAN

SERIES OF BIOLOGICAL AND MEDICAL

ISSN 2224-5308

Volume 3, Number 309 (2015), 154 – 161

**AGARICALES EDIBLE FUNGI OF PROTECTED AREAS
OF CENTRAL AND NORTH-EASTERN KAZAKHSTAN: CREATION
OF STRAINS COLLECTION AND MOLECULAR IDENTIFICATION**

S. A. Abiev¹, A. V. Shnyreva², G. A. Nam³, R. Z. Asilkhanova¹, G. Abisheva⁴

¹Eurasian National University named after L. N. Gumilyov, Astana,

²Moscow State University named after M. V. Lomonosov, Moscow,

³RSE "Institute of Botany and phytointroduction" MES RK, Almaty,

⁴RSE "National Center for Biotechnology» of the RK, Astana

Keywords: agaricales fungi, collection of strains, macromycetes, mycelial culture, PCR diagnostics.

Abstract. It was studied 94 species of Agaricales fungi on the area of 4 State National nature parks «Kokshetau», «Karkaly», «Burabay» and «Baian-aul». Fungi were grown on a solid agar medium, morphological and cultural characteristics and growth parameters of mycelium of 57 most actively growing strains from 17 species of edible agaricales saprotrophs and xylotrophs were studied. It was done molecular identification of *Psathyrella candolleana* (strain Psc9) and *Pholiota adiposa* (strain Pha4). Results were compared with the dates of corresponding species from the Gene Bank.

On the territory of the four national parks located in the Central and North-East Kazakhstan there were revealed 104 species agaricales fungi belonging to 10 families. Research on solid agar medium features radial mycelial growth and character formation of colonies in 57 strains of the most valuable in respect of 17 species of edible saproxylotrophs and showed the following results. All the strains we investigated were in the rate of slow- and middle growing mycelial colonies. The vast majority of strains (48 strains) had high growth rate at 7-10 days of cultivation, and the remaining strains (9 strains) had the highest growth rate at 17-18 days from the beginning of cultivation. The most dense mycelium becomes over 4-4.5 weeks after the start of cultivation. Pigmentation of colonies is observed on the 33-42 day, mycelial film is formed 39-62 days of cultivation.

УДК 581.5.(235.216)

**СЪЕДОБНЫЕ ГРИБЫ ПОРЯДКА AGARICALES ОСОБО
ОХРАНЯЕМЫХ ПРИРОДНЫХ ТЕРРИТОРИЙ ЦЕНТРАЛЬНОГО
И СЕВЕРО-ВОСТОЧНОГО КАЗАХСТАНА: СОЗДАНИЕ КОЛЛЕКЦИИ
ШТАММОВ И ИХ МОЛЕКУЛЯРНАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ**

С. А. Абиев¹, А. В. Шнырева², Г. А. Нам³, Р. З. Асилханова¹, Г. Абишева⁴

¹Евразийский национальный университет им. Л. Н. Гумилева, Астана, Казахстан,

²Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, Москва, Россия,

³РГП «Институт Ботаники и Фитоинтордукции» МОН РК, Алматы, Казахстан,

⁴РГП «Национальный Центр Биотехнологии» РК, Астана, Казахстан

Ключевые слова: агарикоидные грибы, коллекция штаммов, макромицеты, мицелиальная культура, ПЦР диагностика.

Аннотация. Всего идентифицировано 94 вида агариковых грибов на территории 4-х Государственных национальных природных парков «Кокшетау», «Каркаралы», «Бурабай» и «Баянауыл». Были выделены на твердые агаризованные среды и изучены морфолого-культуральные признаки и ростовые параметры мицелия у 57 штаммов из 17 видов агарикоидных съедобных сапротрофов и ксилотрофов. Была проведена молекулярная идентификация *Psathyrella candolleana* (штамм Psc9) и *Pholiota adiposa* (Pha4) и сопоставление результатов с данными соответствующих видов, депонированных в Gene Bank.

Грибы - ценный пищевой продукт. В настоящее время грибы являются обычным товаром на прилавках продуктовых магазинов во многих странах мира. Если раньше предлагалось потребителю, в основном дикорастущие (лесные) грибы, которые поставляли различные любители "тихой охоты", то сегодня в торговой сети преобладают импортные грибы, выращенные в искусственных условиях. О стремительном росте производства культивируемых грибов говорит тот факт, что уже в 90-е годы в общем объеме ежегодного потребления грибов в мире доля "лесных" составляла только около 20%, а в настоящее время этот показатель неуклонно снижается. В ряде стран мира грибная индустрия приносит большие доходы его производителям и вносит существенный вклад в обеспечение продовольственной безопасности этих стран [1].

В Казахстане, несмотря на его огромные сырьевые возможности, все еще не налажено культивирование грибов в промышленных масштабах. Единичные в республике кустарные производства, предпринимаемые отдельными любителями, работают на завозимом из других стран штаммах. Не создана коллекция отечественных высокоурожайных штаммов съедобных грибов, которая необходима для начала организации в стране промышленного грибоводства.

Традиционно систематика шляпочных грибов основывалась на их морфологических и трофических характеристиках. Однако, такие признаки, как размер и окраска плодовых тел в пределах даже одного вида могут сильно варьировать в зависимости от экологических условий, что нередко приводит к ошибкам при определении их видовой принадлежности. В последнее время в связи с развитием молекулярной биологии и биоинформатики популярным подходом для идентификации грибов становится использование филогенетических маркеров ITS последовательности (межгенной транскрибируемой спейсерной последовательности) кластера генов рибосомальных РНК изучаемого объекта.

Гены, кодирующие структурные гены рРНК являются консервативными последовательностями, в то время как внутренние транскрибируемые спейсерные участки (ITS1/2) эволюционируют быстрее и тем самым - демонстрируют высокий уровень вариабельности [2-4]. Данный факт позволяет использовать спейсерные участки для изучения родственных взаимоотношений между филогенетически близкими видами, в том числе и агарикоидных грибов, а также для молекулярной идентификации грибов, видовая идентификация которых по морфологическим признакам затруднена [5].

Целью настоящей работы было исследование видового состава съедобных агарикоидных грибов Центрального и Северо-Восточного Казахстана, выделение из наиболее ценных видов мицелиальных культур и изучение культурально-морфологических особенностей выделенных в чистую культуру штаммов на различных твердых питательных средах. В задачу данной работы входило также проведение молекулярной идентификации некоторых видов с целью верификации (подтверждения) их видовой принадлежности.

Материалы и методы исследования

Сбор плодовых тел грибов осуществляли во время маршрутных обследований территорий по общепринятой методике. Идентификации грибов проводили на основе макро- и микроморфометрических характеристик с использованием соответствующих определителей [6-8].

Выделение мицелиальных культур высших базидиомицетов. Выделение мицелиальных культур проводили на твердых питательных средах (сусло-агар, картофельно-глюкозный агар, агар Чапека-Докса и Сабуро) тканевым методом непосредственно из плодовых тел. Плодовые тела грибов собирали в период их массового появления. Выделение мицелиальных культур проводили в день сбора образцов или же из плодовых тел, хранившихся в холодильнике не более 3 суток. Для выделения выбирали молодые, крепкие, неинфицированные карпофоры. Перед выделением плодовое тело очищали от посторонних примесей и промывали в проточной и стерильной воде, просушивали фильтровальной бумагой. Затем плодовое тело обрабатывали 96°- этиловым спиртом. Кусочки трамы, вырезанные кубиком (0,5-0,8 см³) из разных частей плодового тела (шляпки, ножки, мест перехода шляпки в ножку) стерильным пинцетом переносили на твердую питательную среду. В питательную среду добавляли ампициллин (100-200 ед/мл) или фундазол (50 мкг/мл) для подавления роста посторонней микрофлоры. Чашки Петри с инокулюмом инкубировали в

термостате при температуре 26,5°C. Для очистки культур от случайных посторонних инфекций, кроме антибиотиков, использовали метод повторных пересевов. Все операции по выделению тканевых культур проводили в ламинарном боксе.

Выделение ДНК. Для выделения ДНК использовали буферный раствор, содержащий 100 mM Tris-HCl, pH 8,0, 1,4 M NaCl, 20 mM EDTA, 2% СТАВ, протеиназу К 100 µg/ml [9,10,11]. Брали 10-12 суточные мицелиальные культуры, помещали в стерильную ступку, добавляли жидкий азот и растирали до гомогенного состояния. 100 мкл полученной суспензии переносили в стерильную 1,5 мл пробирку, добавляли 500 мкл соответствующего буфера. Инкубировали в течение 18 часов. Далее проводили очистку ДНК фенол/хлороформным методом. С этой целью к полученной суспензии добавляли 750 мкл хлороформ/изоамилового спирта (24:1), тщательно перемешали и центрифугировали при 12000 об/мин в течение 10 минут. Водную фазу переносили в новую пробирку и повторяли очистку со смесью фенол/хлороформ (1:1). После центрифугирования водную фазу переносили в новые чистые пробирки и осаждали ДНК 600 мкл изопропилового спирта. Центрифугировали при 12000 об/мин в течение 10 минут, осадок ДНК промывали 70% этиловым спиртом с последующим центрифугированием и удалением жидкой фазы. Затем осадок подсушивали на воздухе в течение 15 минут. Образцы ДНК растворяли в 100 мкл однократного TE буфера и хранили при минус 20°C. Концентрацию ДНК измеряли с использованием спектрофотометра NanoDrop при длине волны 260 нм.

Аmplификация ITS последовательности. ПЦР проводили с праймерами ITS 5' – ggaagtaaaagtctgaacaagg-3' и ITS 4' – tcctccgcttattgatatgc -3' в общем объеме реакционной смеси 30 мкл. ПЦР смесь содержала 40 нг ДНК, 1ед. Taq DNA Polymerase (Fermentas), 0,2 mM каждого дНТФ (дезоксинуклеозотрифосфата), 1-кратный ПЦР буфер (Fermentas), 2,5 mM MgCl₂, 10 пмоль каждого праймера. Программа ПЦР амплификации включала первичную денатурацию при 95°C в течение 4 минут с последующими 30 циклами: 95°C – 25 секунд, 52°C- 30 секунд, 72°C – 40 секунд; заключительная элонгация 7 минут при 72°C. ПЦР проводили в амплификаторе DNA Engine Tetrad 2 Cyclor PTC-0240 (Bio-Rad).

Определение нуклеотидной последовательности. Очистку ПЦР продуктов от несвязавшихся праймеров проводили ферментативным методом используя Exonuclease I (Fermentas) и щелочную фосфатазу (Shrimp Alkaline Phosphatase, Fermentas).

Реакцию секвенирования проводили с применением BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) согласно инструкции производителя, с последующим разделением фрагментов на автоматическом генетическом анализаторе 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems).

Молекулярную идентификацию штаммов грибов проводили методом определения прямой нуклеотидной последовательности ITS региона и сопоставлением ее идентичности с нуклеотидными последовательностями видов, депонированных в международной базе данных GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov).

Результаты исследования

Обследование и сбор плодовых тел грибов осуществляли на территории четырех государственных национальных природных парков «Кокшетау», «Бурабай» «Каркаралы» и «Баянауыл», расположенных в центральной и северо-восточной части Казахстана. Выбор территорий нацпарков связан с тем, что эти территории менее подвержены воздействию человека и отличаются более богатым, эволюционно сложившимся природным разнообразием грибов.

Всего было собрано и идентифицировано 94 вида агарикоидных грибов из 18 семейств и 37 родов, в том числе: *Russulaceae* - 23 видов, *Tricholomataceae* - 13 видов, *Agaricaceae* - 12 видов. Остальные семейства (*Boletaceae*, *Paxillaceae*, *Amanitaceae*, *Gomphidiaceae*, *Cortinariaceae*, *Strophariaceae*) включали от 2 до 10 видов. Из сем. *Hygrophoraceae*, *Gloeophyllaceae*, *Hudnangiaceae*, *Tarpinellaceae* и *Psathyrelleaceae* были обнаружены всего по 1 виду. Собранные виды состояли, в основном, из подстилочных и гумусовых сапротрофов. Ряд видов относится к микоризообразователям. Съедобными являются 69, несъедобными – 12 видов, съедобность не установлено у 9 видов. Ядовитые виды немногочисленны - всего 4 вида: *Agaricus xanthodermus*, *Suillus piperatus* *Amanita muscaria*, *Huophiloma sublateritium*.

Характеристика роста мицелиальных колоний различных штаммов грибов на плотной агаризованной среде (сусло-агар)

Штаммы	Время культивирования, сутки				
	Образование паутинно-видного мицелия	Уплотнение Мицелия	Образование плотных мицелиальных бляшек	Образование пигментации на мицелии	Образование мицелиальной пленки
1	2	3	4	5	6
Sg 1 (<i>Suillus granulates</i>)	8	23	29	33	45
Sg 23 (<i>S. granulates</i>)	10	22	27	35	43
Sg 8 (<i>S. granulates</i>)	8	16	22	34	39
Lc 1 (<i>Lyophyllum connatum</i>)	11	20	25	43	52
Lc 15 (<i>L. connatum</i>)	11	22	24	37	50
Lc 18 (<i>L. connatum</i>)	9	16	20	33	48
Phs 3 (<i>Pholiota squarrosa</i>)	18	25	31	39	65
Phs 10 (<i>P. squarrosa</i>)	16	24	33	39	62
Phs15 (<i>P. squarrosa</i>)	17	28	35	42	61
Km25 (<i>Kuehneromyces mutabilis</i>)	10	23	33	35	45
Km 34 (<i>K. mutabilis</i>)	12	23	30	34	45
Pp 4 (<i>Pleurotus pulmonarius</i>)	18	28	36	42	62
Pp 6 (<i>P. pulmonarius</i>)	16	27	34	41	63
Pp 8 (<i>P. pulmonarius</i>)	19	30	37	44	64
Pp 12 (<i>P. pulmonarius</i>)	18	29	37	45	65
Cg 3 (<i>Clitocybe gibba</i>)	7	16	25	31	39
Cg 5 (<i>C. gibba</i>)	9	17	24	33	39
Cg 7 (<i>C. gibba</i>)	8	15	23	32	40
Cg 19 (<i>C. gibba</i>)	6	17	25	31	42
Leccs 2 (<i>Leccinum scabrum</i>)	7	15	26	29	39
Leccs 16 (<i>L. scabrum</i>)	8	16	23	30	41
Leccs 18 (<i>L. scabrum</i>)	10	14	21	29	43
Leccs 24 (<i>L. scabrum</i>)	9	16	21	28	46
Agt 6 (<i>Agaricus tabularius</i>)	9	16	22	29	43
Agt 7 (<i>A. tabularius</i>)	8	17	23	32	47
Agt 12 (<i>A. tabularius</i>)	10	18	24	29	45
Lacc 4 (<i>Lactarius controversus</i>)	9	16	25	32	49
Lacc 15 (<i>L. controversus</i>)	11	19	26	31	47
Lacc 16 (<i>L. controversus</i>)	8	16	24	32	48
Lacc 22 (<i>L. controversus</i>)	10	17	26	33	51
Pi 1 (<i>Paxillus involutus</i>)	9	16	22	32	47
Pi 6 (<i>P. involutus</i>)	9	16	23	32	49
Pi 9 (<i>P. involutus</i>)	11	18	24	30	41
Ld 5 (<i>Lactarius deliciosus</i>)	10	16	25	34	53
Ld 9 (<i>L. deliciosus</i>)	9	17	26	32	47
Lp 2 (<i>Lactarius pubescens</i>)	9	17	24	35	52
Lp 14 (<i>L. pubescens</i>)	11	19	25	35	50
Lp 23 (<i>L. pubescens</i>)	10	16	24	37	49
Be 8 (<i>Boletus edulis</i>)	9	17	26	34	47
Be 12 (<i>B. edulis</i>)	10	18	27	33	49
Be 17 (<i>B. edulis</i>)	10	18	25	31	53
Be 20 (<i>B. edulis</i>)	11	17	25	32	54
Lv 7 (<i>Lactarius vellereus</i>)	10	16	26	31	51
Lv 13 (<i>L. vellereus</i>)	9	15	24	32	49
Lv 16 (<i>L. vellereus</i>)	11	17	26	32	51
Psc 4 (<i>Psathyrella candolleana</i>)	9	14	23	30	39
Psc 7 (<i>P. candolleana</i>)	8	15	24	32	39
Psc 9 (<i>P. candolleana</i>)	7	15	23	31	38
Psc 12 (<i>P. candolleana</i>)	9	13	24	30	39

Продолжение таблицы					
1	2	3	4	5	6
Agd 3 (<i>Agrocybe dura</i>)	9	14	25	32	40
Agd 6 (<i>A. dura</i>)	8	14	24	30	37
Agd 8 (<i>A. dura</i>)	7	13	25	31	39
Agd 9 (<i>A. dura</i>)	7	14	26	30	37
Agd 13 (<i>A. dura</i>)	8	14	24	31	36
Agd 14 (<i>A. dura</i>)	8	13	24	31	37
Pha 2 (<i>Pholiota adiposa</i>)	13	19	27	37	47
Pha 4 (<i>P. adiposa</i>)	12	19	28	37	47

Из 17 видов агарикоидных съедобных сапро- и ксилотрофов было выделено 57 штаммов. Культурально-морфологические признаки исследуемых штаммов изучали на различных агаризованных питательных средах (сусло-агар, картофельно-глюкозный агар, агар Чапека-Докса и Сабуро). Более подходящим для мицелиального роста был сусло-агар. Учет особенностей роста колоний проводили в течение всего срока наблюдения по следующим показателям: текстура и форма колоний, пигментация мицелия, плотность и высота воздушного мицелия, среднесуточная скорость роста, ростовой коэффициент.

Особенности радиального роста и сроки наступления последующих фаз изменений мицелиальных колоний штаммов показаны на рисунке.

Согласно классификации А. С. Бухало [12], мицелиальные колонии базидиальных грибов по скорости роста можно разделить на три группы: I – быстрорастущие (PK > 100), II – растущие со средней скоростью (PK = 50-100) и III – медленно растущие (PK < 50). Все исследованные нами штаммы относились к группе медленно- и среднерастущих мицелиальных колоний. На плотной агаризованной среде (сусло-агар) на начальном этапе роста мицелии паутинистые, затем мучнистые, позже войлочные, стелящиеся по субстрату. Полное зарастание питательной среды в чашках Петри (d = 95 мм) у большинства штаммов происходило через месяц.

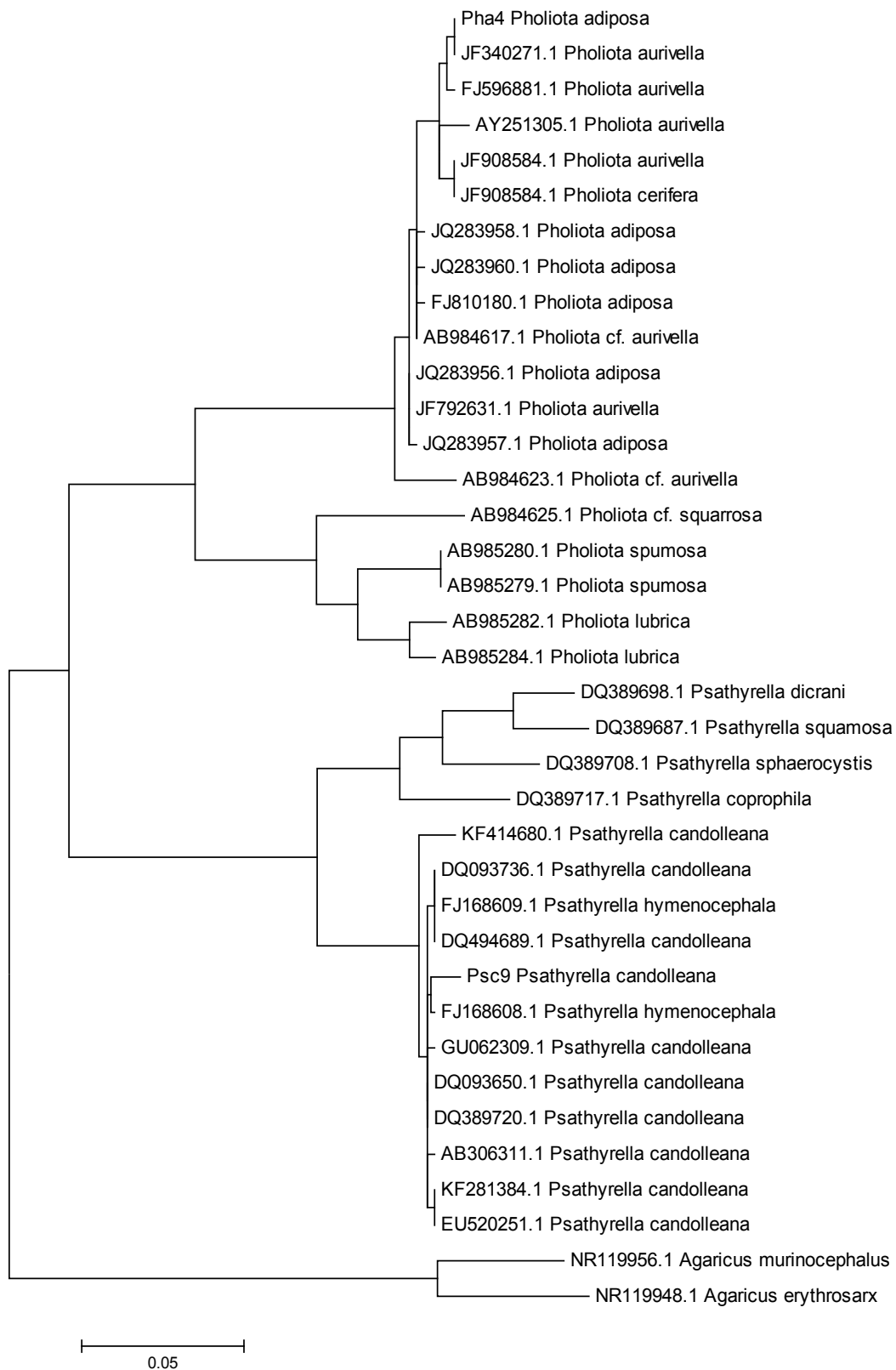
У подавляющего большинства штаммов (48 штаммов): Sg-1, Sg-8, Sg-23, Lc-1, Lc-15, Lc-18, Km-25, Km-34, Cg-3, Cg-5, Cg-7, Cg-19, Ls-2, Ls-16, Ls-18, Ls-24, Agt-6, Agt-7, Agt-12, Lacc-4, Lacc-15, Lacc-16, Lacc-22, Pi-1, Pi-6, Pi-9, Ld-5, Ld-9, Lp-2, Lp-14, Lp-23, Be-8, Be-12, Be-17, Be-20, Lv-7, Lv-13, Lv-16, Psc-4, Psc-7, Psc-9, Psc-12, Agd-3, Agd-6, Agd-8, Agd-9, Agd-13, Agd-14 - наибольший радиальный скорость роста колоний наблюдалась на 7-10 сутки культивирования. У остальных штаммов (9 штаммов): Phs-3, Phs-10, Phs-15, Pp-4, Pp-6, Pp-8, Pp-12, Pha-2, Pha-4 - наибольшие ростовые показатели были отмечены на 17-18-е сутки с начала культивирования.

Начало уплотнения мицелия отмечалось на 12-17-е сутки культивирования, но наиболее плотный ватно-войлочный мицелий с бляшками формировался спустя месяц с момента инокуляции среды в чашках Петри. Образование пигментации на мицелии наблюдалось на 28 (Lec18 (*L. scabrum*) – 45 (Pp12 (*P. pulmonarius*)) сутки, образование мицелиальной пленки – на 38 (Psc 9 (*P. candolleana*)) - 64 (Pp 8 (*P. pulmonarius*)) сутки.

Анализ нуклеотидных последовательностей. Для верификации идентификации двух видов агариковых грибов (*Psathyrella candolleana* и *Pholiota adiposa*) брали два соответствующих штамма - Psc9 и Pha4. Для построения филогенетического дерева родства видов на основе отсековированных ITS последовательностей рДНК данных штаммов использовали метод максимального правдоподобия (ML) из пакета компьютерных программ Mega 5 [13]. Обсчет проводили по 705 сайтам отсековированных ITS последовательностей.

Нуклеотидные последовательности были проанализированы и объединены в общую последовательность в программе SeqMan (DNASar). Затем были удалены концевые фрагменты (нуклеотидные последовательности праймеров и фрагменты, имеющие низкий показатель качества). Полученные последовательности были идентифицированы с использованием баз данных GenBank по алгоритму BLAST.

Молекулярная идентификация нуклеотидных последовательностей изученных нами 2-х штаммов (Psc9, Pha4), принадлежащих двум видам агарикоидных грибов (*Psathyrella candolleana* и *Pholiota adiposa*), и сравнительный анализ с гомологичными ITS последовательностями из GenBank (HQ436117.1 *Psathyrella candolleana*; HQ436122.1 *Pholiota adiposa*) показали их 99%-ное



Филогенетическое дерево сходства на основе ITS последовательностей между штаммами Psc9 *Psathyrella candolleana*, Pha4 *Pholiota adiposa* и последовательностями из ГенБанка. Дерево построено с использованием алгоритма ML (Maximum Likelihood) в программе MEGA5

сходство для обоих изученных штаммов. Для более надежного подтверждения видовой принадлежности штаммов Psc9 и Pha4 был проведен филогенетический анализ родства на основе ITS последовательностей между этими штаммами и выборками ITS последовательностей штаммов, депонированных в ГенБанке (рисунок). На дендрограмме штамм Psc9 попал в группу, объединившую все штаммы *P. candolleana*, последовательности которых были взяты из ГенБанка. Поэтому мы считаем, что штамм Psc9 принадлежит виду *Psathyrella candolleana*. Штамм Pha4 попал в кладу, объединившую два близкородственных вида *Ph. adiposa* и *Ph. aurivella*, причем этот штамм Pha4 попал в подкладу со штаммами *Ph. aurivella* из Ген Банка. Согласно Index Fungorum, названия видов *Ph. adiposa* и *Ph. aurivella* являются синонимами, поэтому штамм Pha4 из нашей коллекции мы относим к виду *Pholiota adiposa*, как это было определено на основе макроморфологических характеристик с использованием «Флора споровых растений Казахстана, Том 13. часть 1,2» [6, 7].

Таким образом, в результате проведенного исследования была создана и охарактеризована коллекция мицелиальных культур агарицидных базидиомицетов, которая насчитывает 57 штаммов, принадлежащих 17 видам. Данные виды являются наиболее распространенными видами в изученных нами национальных парках Казахстана. Для культивирования в лабораторных условиях штаммов, выделенных из природных популяций подобраны оптимальные среды и условия культивирования. Видовая принадлежность двух штаммов из коллекции была подтверждена молекулярным методом.

Заключение. На территории трех национальных природных парков, расположенных в Центральном и Северо-Восточном Казахстана выявлено 104 вида агарицидных грибов, относящихся к 10 семействам. Исследования на плотной агаризованной среде особенностей радиального роста мицелия и характера образования колоний у 57 штаммов из наиболее ценных в съедобном отношении 17 видов сапро- и ксилотрофов показали следующие результаты. Все исследованные нами штаммы по скорости роста относились к группе медленно- и среднерастущих мицелиальных колоний. У подавляющего большинства штаммов (48 штаммов) высокая скорость роста наблюдалась на 7-10 сутки культивирования, а у остальных штаммов (9 штаммов) наибольшие ростовые показатели были отмечены на 17-18 сутки с начала культивирования. Наиболее плотным мицелий становится через 4-4,5 недели после начала культивирования. Пигментация колоний наблюдается на 33-42 день, мицелиальная пленка образуется 39-62 дни культивирования.

Молекулярная идентификация нуклеотидной последовательности изученных нами 2-х штаммов (*Psc9, Pha4*) из 2 видов агарицидных грибов (*Psathyrella candolleana* и *Pholiota adiposa*) и ее сравнительный анализ с данными Gene Bank (HQ436117.1 *Psathyrella candolleana*; HQ436122.1 *Pholiota adiposa*) по обоим штаммам одинаково показали 99% совпадение.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Заикина Н.А., Коваленко А.Е., Галынкин В.А., Дьяков Ю.Т. и др. Основы биотехнологии высших грибов. – СПб.: Проспект науки, 2007. – 336 с.
- [2] Пробатова Н.С., Коцеруба В.В., Муртазалиев Р., Хубен А., Блаттнер Ф. Филогения рода *Milium* L., основанная на ITS секвенировании рибосомальной ДНК. Вычислительная филогенетика и геносистематика «ВФГС 2007». – М., 2007. – С. 253-255.
- [3] Baldwin B.G. Phylogenetic utility of the internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA in plants: an example from the Compositae // *Molecular Phylogenetic and Evolution*. 1992. Vol. 1. – P. 3-16.
- [4] Шнырева А.А., Шнырева А.В. Молекулярно-генетический анализ съедобных культивируемых грибов рода *Pleurotus*. Современная микология в России. – Т. 3. – Материалы 3-го Съезда микологов России. – М., 2012. – С. 52-53.
- [5] Laszlo G. Nagi, Grit Walther, Judit Hazi, Csaba Vagvolgyi, and Tamas Papp. Understanding the evolutionary processes of fungal fruiting bodies: Correlated evolution and divergence times in the *Psathyrellaceae* // *Syst. Biol.* – 2011. – 60(3). – P. 303-317.
- [6] Флора споровых растений Казахстана. – Т. 13. Агариковые грибы. – Ч. 1. – Алма-Ата, 1981.
- [7] Флора споровых растений Казахстана. – Т. 13. Агариковые грибы. – Ч. 2. – Алма-Ата, 1985.
- [8] Флора споровых растений Казахстана. – Т. 4. – Гетеробазидиальные и Автобазидиальные грибы. – Алма-Ата, 1964.
- [9] Henrion B., Chevalier G., Martin F. Typing truffle species by PCR amplification of the ribosomal DNA spacers // *Mycol. Res* 99. – 1994. – P. 1321-1324.
- [10] Muruke MHS, Kivaisi AK, Magingo FSS, Danell. Identification of mushroom mycelia using DNA techniques // *Tanz J. Sci.* – 2002. – Vol. 28 (1). – P. 115-128.

- [11] Manjunathan J., Kumar M., Kaviyaran V. Taxonomic studies, Rapid and efficient protocol for DNA extraction, purification, molecular characterstict of the Basidiomycete *Lentinus Tuberregium* (FR) GQ292711 // *Asian J Pharm Clin Res.* – 2011. – Vol. 4, Issue 2. – P. 54-58.
- [12] Культивирование съедобных и лекарственных грибов. Практические рекомендации / Под ред. А. С. Бухало. – Киев: Изд. Чернобыльинтеринформ., 2004. – 128 с.
- [13] Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods // *Molecular Biology and Evolution.* – 2011. – 28. – P. 2731-2739.

REFERENCES

- [1] Zaikina N.A., Kovalenko A.E., Galynkin V.A., Dyakov Yu.T. and others. Fundamentals of Biotechnology of higher fungi. SPb., Prospect of Science, 2007. 336 pp. (in Russ.).
- [2] Probatova N.S., Kotseruba V.V., Murtazaliyev R., Huben A., Blattner F. Phylogeny of the *Milium L.* types, based on ITS ribosomal DNA sequencing. Computational phylogenetics, and molecular systematics "VFGS 2007". Moscow, 2007. P. 253-255. (in Russ.).
- [3] Baldwin B.G. Phylogenetic utility of the internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA in plants: an example from the Compositae. *Molecular Phylogenetic and Evolution.* 1992. Vol. 1. P. 3-16.
- [4] Shnyreva A.A., Shnyreva A.V. Molecular genetic analysis of cultivated edible fungi of the genus *Pleurotus*. *Modern Mycology in Russia.* Vol. 3. Proceedings of the 3rd Congress of Russian mycologists. M., 2012. P. 52-53. (in Russ.).
- [5] Laszlo G. Nagi, Grit Walther, Judit Hazi, Csaba Vagvolgyi, and Tamas Papp. Understanding the evolutionary processes of fungal fruiting bodies: Correlated evolution and divergence times in the Psathyrellaceae. *Syst. Biol.* 2011. 60(3). P. 303-317.
- [6] Flora of spore plants of Kazakhstan. Vol. 13. Agaricales fungi. P. 1, Alma-Ata, 1981. (in Russ.).
- [7] Flora of spore plants of Kazakhstan. Vol. 13. Agaricales mushrooms. P. 2, Alma-Ata, 1985. (in Russ.).
- [8] Flora of spore plants of Kazakhstan. Vol. 4. Heterobasidial and autobasidial fungi. Alma-Ata, 1964. (in Russ.).
- [9] Henrion B., Chevalier G., Martin F. Typing truffle species by PCR amplication of the ribosomal DNA spacers. *Mycol. Res* 99. 1994. P. 1321-1324.
- [10] Muruke MHS, Kivaisi AK, Magingo FSS, Danell. Identification of mushroom mycelia using DNA techniques. *Tanz J. Sci.* 2002. Vol. 28 (1). P. 115-128.
- [11] Manjunathan J., Kumar M., Kaviyaran V. Taxonomic studies, Rapid and efficient protocol for DNA extraction, purification, molecular characterstict of the Basidiomycete *Lentinus Tuberregium* (FR) GQ292711. *Asian J Pharm Clin Res.* 2011. Vol. 4, Issue 2. P. 54-58.
- [12] Cultivation of edible and medicinal fungi. Practical recommendations. Ed. A. S. Buhalo. Kiev: Ed. Chernoby-linterinform., 2004. 128 p. (in Russ.).
- [13] Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution.* 2011. 28. P. 2731-2739.

**ҚАЗАҚСТАННЫҢ ОРТАЛЫҚ ЖӘНЕ СОЛТҮСТІК-ШЫҒЫС АЙМАҒЫНДА ОРНАЛАСҚАН
АЙРЫҚША ҚОРҒАЛАТЫН ТАБИҒИ АЙМАҚТАРДЫҢ АГАРИКА САҢЫРАУҚҰЛАҚТАРЫ:
ШТАММДАР КОЛЛЕКЦИЯСЫН ҚҰРУ ЖӘНЕ МОЛЕКУЛАЛЫҚ ИДЕНТИФИКАЦИЯЛАУ**

С. А. Абиев., А. В. Шнырева, Г. А. Нам, Р. З. Асылханова, Г. Абишева

Тірек сөздер: агарикалық саңырауқұлақтар, штаммдық коллекция, макромицеттер, мицелиальды культура, ПТР диагностикасы.

Аннотация. «Кокшетау», «Каркаралы», «Бурабай» и «Баянауыл» Мемлекеттік ұлттық табиғи парктөрдің аумағында агарика саңырауқұлақтарының 94 түрі анықталды. Қатты агарлы қоректік орталаларда 17 түрге жататын жеуге жарамды сапро- және ксилотрофты агарикалық саңырауқұлақтардан бөлініп алынған 57 штамның культуралық-морфологиялық ерекшеліктері мен мицелилік колонияларының өсу-даму көрсеткіштері зерттелді. Екі түрге: *Psathyrella candolleana* (Psc9) және *Pholiota adiposa* (Pha4) молекулалық идентификация жүрізіліп, алынған нәтижелер Gene Bank қорындағы сәйкес түрлердің мәліметтермен салыстырылды.

Поступила 20.05.2015 г.

Правила оформления статьи для публикации в журнале смотреть на сайте:

[www:nauka-nanrk.kz](http://www.nauka-nanrk.kz)

biological-medical.kz

Редактор *М. С. Ахметова*
Верстка на компьютере *Д. Н. Калкабековой*

Подписано в печать 22.05.2015.
Формат 60x881/8. Бумага офсетная. Печать – ризограф.
10,4 п.л. Тираж 300. Заказ 3.